PERKUTANE RESORPTION VON BLUTEGELWIRKSTOFFEN (EGLIN UND HIRUDIN) AN DER ISOLIERTEN SCHWEINEHAUT UND IM IN VIVO-MODELL AN DER MAUS

Herbert Bruckbauer

Diss
München
1984

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Hans Fritz

PERKUTANE RESORPTION VON BLUTEGELWIRKSTOFFEN (EGLIN UND HIRUDIN) AN DER ISOLIERTEN SCHWEINEHAUT UND IM IN VIVO-MODELL AN DER MAUS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Herbert Bruckbauer
aus
Neufahrn
Jahr
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Fritz
Mitberichterstatter:	
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	15.11.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
A.1	Charakterisierung der Protein-Proteinase-Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo medicinalis	1
A.1.1	Hirudin	2
A.1.2	Egline	5
A.1.3	Bdelline	8
A.2	Therapeutische Anwendung der Blutegelwirkstoffe	10
A.3	Resorptionsmechanismen der Haut	11
A.3.1	Morphologie der Haut	11
A.3.2	Funktionen der Haut	14
A.3.3	Resorptionsmechanismen	15

		Seite
A.4	Perkutane Resorption von Blutegelwirkstoffen	17
A.4.1	In vivo- und in vitro-Studien am Meerschweinchen (64) mit Hirudin, Eglin und Bdellin	18
A.4.2	In vitro-Versuche an der isolierten Schweinehaut mit Hirudin und Eglin (16)	18
A.5	Aufgabenstellung	19
B	MATERIAL UND METHODEN	20
B.1	Substanzen	20
B.1.1	Enzyme	20
B.1.2	Substrate	20
B.1.3	Blutegelrohextrakt	20
B.1.4	Salben	21
	Salben mit Blutegelextrakt	21
	Enthaarungscreme	21
B.1.5	Materialien für die Säulenchromatographie	21

		Seite
B.2	Apparate	21
B.3	Enzym- und Hemmtests	22
B.3.1	Thrombintest mit Chromozym TH und Thrombin-hemmtest	23
B.3.2	Chymotrypsintest mit Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (Suc-Phe-pNA) und Chymotrypsin-hemmtest	24
B.4	Konzentrierung der Inhibitorlösung	26
B.5	Gelchromatographische Auftrennung der radioaktiv markierten Inhibitoren nach Komplexierung mit Thrombin bzw. Chymotrypsin	27
B.5.1	Radioaktive Markierung von Hirudin und Eglin	27
B.5.2	Gelchromatographie an Sephadex G-75	28
B.5.3	Gelchromatographische Detektion von Hirudin	29
	Hirudin	29
	Hirudin-Thrombin-Komplex	29
	Aus dem Komplex freigesetztes Hirudin	29
B.5.4	Gelchromatographische Detektion von Eglin	30
	Eglin	30
	Eglin-Chymotrypsin-Komplex	30

Seite

B.6 In vitro Resorptionsversuche an der isolierten Schweinehaut 30

B.6.1 Resorptionsmodell nach Stricker 30

B.6.2 Schweinehaut 32

B.6.3 Allgemeine Versuchsdurchführung 32

B.7 In vivo Resorptionsversuche an der Maus 35

B.7.1 Allgemeine Versuchsbedingungen 35
Versuchstiere 35
Enthaarung 35
Salbenzubereitung 36
Behandlung der Mäuse mit Blutegelsalbe 36
Blutentnahme und Probenaufbereitung 37
Uringewinnung und Probenaufbereitung 37

B.7.2 Konzentration der Radioaktivität im Blut in Abhängigkeit von der applizierten Radioaktivitätsmenge 38

B.7.3 Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption 39

B.7.4 Quantitative Bestimmung von ^{125}J-markiertem Hirudin und Eglin im 24 Stunden-Urin nach Salbenapplikation 39

B.7.5 Verteilung der Radioaktivität nach Resorption von ^{125}J-markiertem Hirudin und Eglin im Blut, Urin und in den Organen der Maus 40

		Seite
C	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
C.1	In vitro Versuche	42
C.2	In vivo Versuche	55
C.2.1	Radioaktivitätskonzentration im Blut in Abhängigkeit von der applizierten Radioaktivitätsmenge	56
C.2.2	Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption	60
C.2.3	Quantitative Auswertung der perkutanen Resorption biologisch aktiver Inhibitoren und deren Verteilung in Blut und Urin	66
C.2.3.1	Radioaktivitätsmessungen	67
C.2.3.2	Biologische Aktivitätsmessungen	71
C.2.4	Inhibitorausscheidung im 24 Stunden-Harn	77
C.2.5	Verteilung der Radioaktivität in den Organen	80
D	ZUSAMMENFASSUNG	84
E	LITERATURVERZEICHNIS	86

Verzeichnis der Abkürzungen

Ala - Alanin
Arg - Arginin
Asn - Asparagin
Asp - Asparaginsäure
Asx - Asn oder Asp
Cys - Cystein
Gln - Glutamin
Glu - Glutaminsäure
Glx - Gln oder Glu
Gly - Glycin
Ile - Isoleucin
Leu - Leucin
Lys - Lysin
Pro - Prolin
Ser - Serin
Thr - Threonin
Tyr - Tyrosin
Val - Valin

A	Flächeneinheit [cm^2]
Ac	Acetat
ATE	Antithrombin-Einheit
BAK	Blut-*Aktivitätskonzentration [cpm/ml Blut]
BK	Blutkonzentration der Wirkstoffe [ATE,g,IU/ml Blut]
sBK	spezifische Blutkonzentration der Wirkstoffe [ATE,g,IU/ml/cm^2/kg]
BSK	Blut-Salbenkonzentration [mg Salbe/ml Blut]
sBSK	spezifische Blut-Salbenkonzentration [mg Salbe/ml Blut/cm^2 Haut/kg Körpermasse]
Δc	Salben-Wirkstoffkonzentration [ATE,g,IU/g Salbe]
cpm	counts per minute
EI-Komplex	Enzym-Inhibitor-Komplex
HP	Haut-Permeation [x/cm^2; x = cpm; IU; g usw.]
HP_t	Haut-Permeation zu einem bestimmten Zeitpunkt t [h]
HPR	Haut-Permeationsrate [x/h/cm^2]
HPR_u	Urinanteil u der Haut-Permeationsrate [x/h/cm^2]
IU bzw. mIU	Inhibitor-Unit bzw. milli-Inhibitor-Unit
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit
M	Substanzmenge [cpm; IU; g usw.] bzw. Körpermasse [kg]
M(t)	zeitlich [h] abhängige Substanzmenge

N.I.H.-E.	"National Institute of Health" - Einheit Thrombin
pNA	p-Nitroanilin
SAK	Salben-*Aktivitätskonzentration [cpm/g Salbe]
SHP	Standard-Haut-Permeation [1 bzw. g/cm²]
SHP_t	Standard-Haut-Permeation zu einem bestimmten Zeitpunkt t [h]
SHPR	Standard-Haut-Permeationsrate [1 bzw. g/h/cm²]
$SHPR_u$	Urinanteil u der Standard-Haut-Permeationsrate [1 bzw. g/h/cm²]
Suc-Phe-pNA	N^{α} -Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid
t	Zeiteinheit [h]
Tos/Gly-Pro-Arg-pNA-HCl	Tosyl/Glycin-Prolin-Arginin-pNA-HCl
TRA	Triäthanolamin
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Fritz möchte ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit danken. Dank seiner Großzügigkeit und seiner positiven Einstellung, machte es Freude unter seiner Leitung zu arbeiten.

Frau Dr. Ursula Seemüller gilt mein aufrichtiger Dank für die jederzeit freundliche Beratung und Unterstützung. Sie wies mich in die praktische Arbeit mit Proteaseinhibitoren ein, stellte mir Eglin zur Verfügung und stand mir mit Rat und Tat bei der Versuchsplanung und Durchführung zur Seite.

Herrn J. Dodt danke ich für die Bereitstellung von Hirudin.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich bei meiner Labortätigkeit hilfreich unterstützten, möchte ich mich bedanken.

Für die radioaktive Markierung meiner Substanzen Hirudin und Eglin bedanke ich mich bei Herrn Prof. E. Fink, Herrn Dr. W. Müller-Esterl, Frau Dr. U. Seemüller und Herrn J. Dodt.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. Scheuber für seine Hilfsbereitschaft. Er betreute mich im Tierlabor und half mir jederzeit bei meinen Problemen.

Für das Tippen der Arbeit danke ich ganz herzlich meiner lieben Freundin Angela.

A EINLEITUNG

A.1 Charakterisierung der Protein-Proteinase-Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo medicinalis

Protein-Proteinase-Inhibitoren sind Proteine oder Glykoproteine, die mit einer oder mehreren Proteinasen im stöchiometrischen Verhältnis zumeist reversible Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen der Enzyme gehemmt sind (28). Diese Definition umfaßt die niedermolekularen mikrobiellen, sowie die meisten pflanzlichen und tierischen Inhibitoren mit Molekulargewichten bis ca. 50 000.

Bis heute konnten folgende Proteinase-Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo medicinalis isoliert und teilweise charakterisiert werden:

a) Hirudin - ein thrombin-spezifischer Inhibitor (31, 36),

b) Egline - Inhibitoren mit Hemmaktivität gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die neutralen Proteinasen aus polymorphkernigen Granulozyten Elastase und Kathepsin G (60, 61),

c) Bdelline - Inhibitoren mit Hemmaktivität gegen Trypsin, Plasmin und Akrosin (15, 50).

A.1.1 Hirudin

Hirudin hemmt spezifisch Thrombin, ein Enzym der Blutgerinnungskaskade (32, 33).
Thrombin liegt im Blut als Prothrombin (Faktor II) vor. Nach Aktivierung von Prothrombin durch Prothrombinase (Faktor III, IV, V, Xa) zum Thrombin (Faktor IIa), katalysiert Thrombin den letzten enzymatischen Schritt der Gerinnungskaskade: Es spaltet vom Fibrinogenmolekül (Faktor I) die Fibrinopeptide A und B ab, wobei Fibrinmonomere (Faktor Ia) entstehen. Die Stabilisierung der polymerisierten Fibrinmonomermoleküle durch kovalente Quervernetzung wird durch den fibrinstabilisierenden Faktor (Faktor XIIIa) katalysiert. Faktor XIII wird ebenfalls von Thrombin in Anwesenheit von Kalziumionen zu Faktor XIIIa aktiviert.

Hirudin verhindert auf Grund seiner hohen Affinität zum Thrombin nicht nur die Fibrinogenspaltung, sondern auch andere durch Thrombin katalysierte Reaktionen, wie z.B. die Aktivierung der Faktoren V, VIII und XIII, sowie die für die Thrombusbildung primär entscheidenden, durch Thrombin ausgelösten Reaktionen der Blutplättchen (77).

Nach Untersuchungen von DAVIE et al. (6) soll Hirudin auch eine Hemmaktivität gegenüber Faktor IXa besitzen. Dies konnte aber in unserem Labor nicht bestätigt werden (J. DODT, persönliche Mitteilungen).

Die gerinnungshemmende Wirkung von Hirudin wird in Antithrombineinheiten (ATE) angegeben (32, 33). Die Aktivität einer NIH-Einheit Thrombin gegenüber dem spezifischen Substrat Fibrinogen wird von einer ATE neutralisiert. Die Reaktion zwischen Thrombin und Hirudin führt praktisch zur sofortigen Hemmung der Enzymaktivität. Dabei bildet sich ein stabiler, äquimolarer Thrombin-Hirudin-Komplex, der sich durch eine sehr kleine Dissoziationskonstante auszeichnet (K_i = 0,63 x 10^{-10} Mol/l; 27).

Hirudin ist ein kohlenhydratfreies Polypeptid bestehend aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 7 000.

Aufgrund des hohen Gehaltes an Glutaminsäure- und Asparaginsäureresten besitzt Hirudin einen niedrigen isoelektrischen Punkt (ca. 3,8 - 4,0). Die Primärstruktur wurde partiell von MAGNUSSON und Mitarbeiter (44) aufgeklärt und von DODT und Mitarbeiter (8) bestätigt und vollendet (Abb. 1).

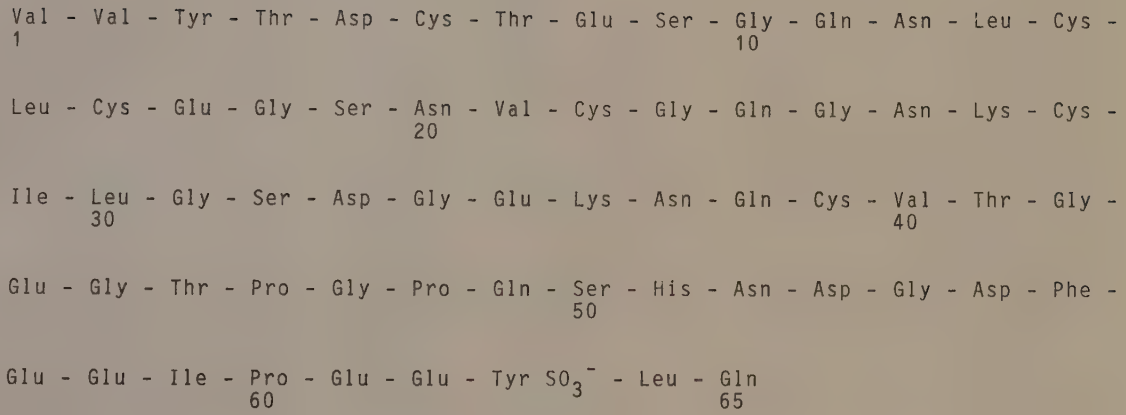

Abb. 1 Aminosäuresequenz von Hirudin (8)

A.1.2 Egline

Die Isolierung und Charakterisierung der Serinproteinase-Inhibitoren Eglin b und Eglin c wurde von SEEMÜLLER(62) durchgeführt.

Das Hemmspektrum der Egline umfaßt die Proteinasen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Die Dissoziationskonstanten der äquimolaren Eglin-Proteinase-Komplexe liegen in der Größenordnung von 10^{-10} mol/l. Trypsin und Pankreas-Elastase werden dagegen nur schwach gehemmt.

Es konnten aus dem als Ausgangsmaterial verwendeten Blutegelrohextrakt zwei Isoinhibitoren in reiner Form isoliert werden, Eglin b und Eglin c. Die Egline bestehen aus 70 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 8073 bzw. 8099. Eglin b und Eglin c unterscheiden sich in der Aminosäurenzusammensetzung durch den Austausch einer Aminosäure (His —— Tyr). Dies sowie ihr wahrscheinlich unterschiedlicher Amidierungsgrad bewirken den Unterschied in ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihrem isoelektrischen Punkt (Eglin b: pI 6,6; Eglin c: pI 6,45).

Beide Egline enthalten interessanterweise weder Cystin noch Cystein. Die Verknüpfung der Polypeptidkette eines Inhibitors durch Disulfidbrücken (Cystine) wurde für die Stabilität der Protein-Proteinase-Inhibitoren hauptsächlich verantwortlich gemacht und deshalb lange Zeit als eine Voraussetzung für die biochemische Wirksamkeit der Inhibitoren, d.h. ihre Interaktion mit Proteinasen, angesehen.

Von medizinischem Interesse ist besonders die Hemmaktivität der Egline gegen die granulozytären Proteinasen Elastase und Kathepsin G. Nach Stimulation der Leukozyten durch Bakterien bzw. Bakterienprodukte, Immunkomplexe, Kristalle (z.B. Harnstoff) oder andere membranaktive Substanzen erfolgt die Freisetzung intrazellulärer Proteasen (u.a. Elastase und Kathepsin G). Diesen lysosomalen Proteasen steht im Körper ein Inhibitorpotential gegenüber, das die freigesetzte Enzymaktivität neutralisiert. Wenn im Zuge eines Entzündungsgeschehens die Hemmkapazität dieser natürlichen Inhibitoren nicht mehr ausreichend ist, kann es zu schweren Gewebeschäden (z.B. Glomerulonephritis, rheumatische und arthritische Erkrankungen) kommen (45, 46).

NH_2 - Thr - Glu - Phe - Gly - Ser - Glu - Leu - Lys - Ser - Phe - Pro - Glu - Val -
1 10

Val - Gly - Lys - Thr - Val - Asp - Gln - Ala - Arg - Glu - Tyr - Phe - Thr - Leu -
20

His - Tyr - Pro - Gln - Tyr - Asp - Val - Tyr - Phe - Leu - Pro - Glu - Gly - Ser -
30 40

Pro - Val - Thr - Leu - Asp - Leu - Arg - Tyr - Asn - Arg - Val - Arg - Val - Phe -

Tyr - Asn - Pro - Gly - Thr - Asn - Val - Val - Asn - His - Val - Pro - His - Val -
60

Gly - COOH
70

Abb. 2 Aminosäuresequenz von Eglin c (62)

A.1.3 Bdelline

1971 wurden von FRITZ und Mitarbeitern die Bdelline aus dem Blutegel isoliert. Bdellin A und Bdellin B sind Protein-Proteinase-Inhibitoren, die Trypsin und Plasmin hemmen (57). Zusätzlich zum Schweineplasmin hemmt Bdellin A besonders stark das Humanplasmin, Bdellin B das Akrosin. Akrosin ist eines der Schlüsselenzyme beim Befruchtungsvorgang. Beim Blutegel wird dieser Inhibitor im Zusammenhang mit seinem Zwitterdasein diskutiert.

Bdellin A und Bdellin B treten in multiplen Formen auf. Die Molekulargewichte der Bdelline A liegen zwischen 6000 und 6300 (mit 56 bis 59 Aminosäuren). Mit 5 Disulfidbrücken besitzen sie einen extrem hohen Gehalt (17 %) an Cystin. Die Bdelline B besitzen Molekulargewichte von ca. 5000 bzw. 16700 (50).

Für Bdellin B 3 (45 Aminosäuren) konnte die Struktur von KREJCI UND FRITZ (26) teilweise aufgeklärt werden.

Tabelle 1: Eigenschaften der Proteinase-Inhibitoren des Blutegels Hirudo medicinalis

	Hirudin	Egline		Bdelline	
		Eglin b	Eglin c	Bdellin A	Bdellin B
Mol.-Gewicht	7043	8073	8099	6000 – 6300	ca. 5000 bzw. 16700*
Anzahl der Aminosäuren	65	70	70	56 - 59	45 bzw. 125*
Primärstruktur	bekannt	bekannt	bekannt	unbekannt	z. T. bekannt (B-3)
Isoelektrischer Punkt (pH)	3,8 - 4,0	6,6	6,45		
Hemmt	Thrombin Faktor IXa ?	Chymotrypsin Subtilisin Elastase** Kathepsin-G**		Trypsin Schweine-Plasmin	
(schwach)		(Trypsin) (Pankreas-Elastase)		Human-Plasmin	Akrosin

* Hochmolekulares Bdellin B (50)

** aus menschlichen Granulozyten

A.2 Therapeutische Anwendung der Blutegelwirkstoffe

Das Ansetzen von Blutegeln gilt als veraltete Therapieform, die allerdings vereinzelt auch heute noch Anwendung findet. Da es unwahrscheinlich ist, daß beim Saugakt des Blutegels eine genügend hohe, therapeutisch wirksame Hirudinmenge über die Bißwunde in den Wirtsorganismus gelangt, dürfte die medizinische Wirksamkeit des Blutegelansetzens nicht allein auf die blutgerinnungshemmende Aktivität des Hirudins zurückzuführen sein.

Eine adäquate, heutzutage angewandte Methode ist die Behandlung mit Salben, die den Blutegelextrakt enthalten; sie fand Anwendung in Klinik und Praxis und konnte positive Ergebnisse aufweisen (3; 4; 18; 49; 78; 79; 81; 7; 25; 43; 63).

Hirudin-haltigen Salben werden antithrombotische, entzündungshemmende, Lymphstrom-beschleunigende und Gefäßkrampf-lösende Eigenschaften zugesprochen. Spezielle Indikationen sind: oberflächennahe Venenentzündungen, oberflächliche Thrombosen, Entzündungen an Krampfadern, Sehnenscheidenentzündungen, Blutergüsse, Prellungen, Zerrungen, Quetschungen, Narbenbeschwerden, entzündliche Infiltrate wie Furunkel und Karbunkel, Injektionsphlebitis, Insektenstiche, Unterschenkelgeschwüre. Der eindeutige perkutane Resorptionsnachweis wurde aber bisher nicht erbracht und oft bezweifelt bzw. negiert (77). Im Rahmen ihrer Dissertationsarbeiten konnten A. STÖLZLE (64), CH. GASTEIGER (16), H. BRUCKBAUER und J. DODT (9) Hinweise erbringen, die für den transkutanen Durchtritt von Hirudin und Eglin sprechen.

A.3 Resorptionsmechanismen der Haut (70, 17, 53)

A.3.1 Morphologie der Haut (Abb. 3 und 4)

Um die Resorptionsvorgänge an der Haut differenzierter betrachten zu können, soll zunächst der anatomische Aufbau dieses Organs dargestellt werden.

Wenn Substanzen die menschliche Haut durchwandern, müssen folgende Kompartimente überwunden werden:

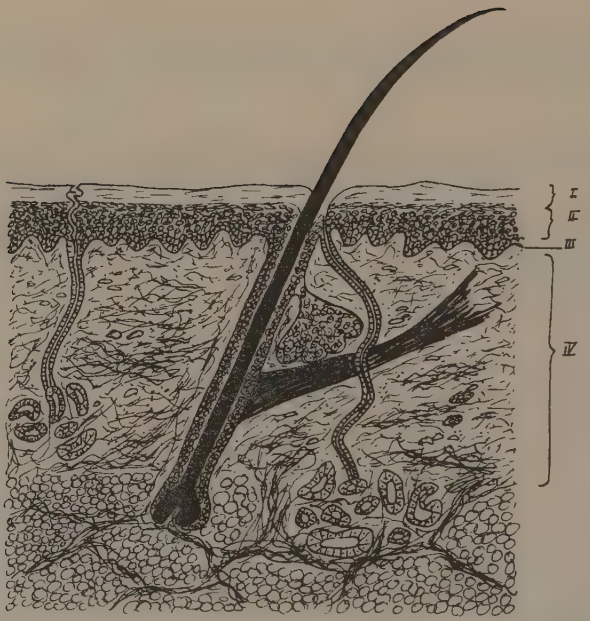

Abb. 3 Querschnitt durch die Haut

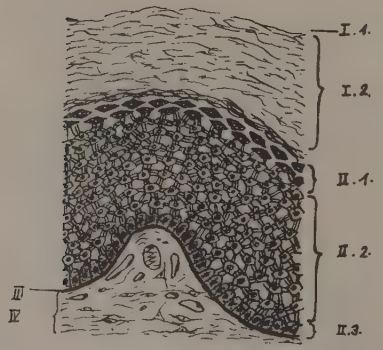

Abb. 4 Epidermis (vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 3)

I. Hornschicht (devitale Zellschichten)

1. Fettfilm (Emulsion)
2. Stratum corneum (Hornschicht)
   a) Stratum disjunctum
   b) Stratum conjunctum

II. Epidermis (Oberhaut, vitale Zellschichten)

1. Stratum granulosum (Körnerschicht)
2. Stratum spinosum (Stachelzellschicht, akanthopapilläre Schicht)
3. Stratum basale (Stratum germinativum, Basalschicht, Keimschicht)

III. epidermale Grenzmembran (Basalmembran)

IV. Corium (Cutis, Dermis, Lederhaut)

1. Grundsubstanzen
2. Adsorbierende Strukturen wie Fasern und Zellen
3. Gefäßwände (Blut- und Lymphsystem)

Ferner befinden sich in der Haut noch Schweißdrüsen und Haarfollikel.

A.3.2 Funktionen der Haut

Aufgaben der Haut sind: mechanischer Schutz, Strahlenschutz, Temperaturregulierung durch Wärmeabgabe (Kreislaufumstellung, Schweiß, thermischer Isolator), physikalisch-chemischer Schutz (Oberflächenfett, Säuremantel), Sinneswahrnehmungen (Wärmeempfindung, Kälteempfindung, Schmerz, Berührung, Kitzel, Juckreiz). In der Haut finden ekkrine (Schweißdrüsen) und holokrine (Talgdrüsen) Sekretionvorgänge statt.

Ein kontinuierlicher Zellschub ausgehend vom Stratum basale, die anschließende Verhornung an der Hautoberfläche und die Abschilferung der Hornschicht führen zur ständigen Erneuerung der Epidermis. Permeationsvorgänge müssen also einen raschen Sekretfluß der Drüsen und einen langsamen Zellschub überwinden.

Die Haut ist andererseits ein Resorptionsorgan (70). Man unterscheidet drei Arten von Durchtrittsvorgängen:

1) Penetration: Eintritt von einer Substanz in eine bestimmte Schicht oder ein bestimmtes Organ.

2) Permeation: Penetration durch eine Schicht in eine andere Schicht, die sich sowohl funktionell als auch strukturell von der ersten Schicht unterscheidet.
Die Permeation erfolgt bis zur gefäßführenden Lederhaut.

3) Resorption: Aufnahme von Substanzen durch das vaskuläre System.

Diese drei Vorgänge werden zusammen als perkutane Resorption (engl. "absorption") bezeichnet (53).

A.3.3 Resorptionsmechanismen

Die Hautdurchlässigkeit ist ein interdisziplinäres Thema, an dem Dermatologen, Pharmakologen, Chemiker, Toxikologen und Biophysiker arbeiten. Prinzipiell kann der Permeationsweg durch die Haut transepidermal, transfollikulär und über die Schweißdrüsenausführungsgänge als Schiene erfolgen. Als Permeationsmechanismus kommt wahrscheinlich nur die Diffusion in Frage. Regionäre, altersbedingte, artdifferente, substanzabhängige, u.a. Verhältnisse bedingen Unterschiede in der Permeabilität der Haut.

a) Transepidermale Permeation

Bei dieser Durchtrittsform ist die Hornschicht (Stratum corneum) als entscheidende Barriere zu betrachten. Der Transport durch diese Barriere erfolgt rein passiv durch Diffusion. Die Permeation durch das Stratum corneum erfolgt entweder interzellulär (dies gilt z.B. für Elektrolyte, da die Zellmembranen für sie undurchlässig sind)(42) oder transzellulär (dies gilt z.B. insbesonders für niedermolekulare, polare Verbindungen)(54). Der Permeationsvorgang kann durch Okklusivverbände, die eine Wasseraufnahme begünstigen, aktiviert werden. Die Menge an permeierender Substanz kann auf diese Weise um eine Zehnerpotenz erhöht werden.

EBBECKE (54) meint, daß Einreiben über eine Veränderung der elektrostatischen Situation der Haut (Druckeffekt) zur Permeationssteigerung führt. Er nimmt an, daß dadurch die Möglichkeit für die Permeation negativ geladener Substanzen geschaffen wird. Ferner soll das Einreiben eine Förderung der druckmechanischen Einschleusung höhermolekularer Substanzen in die Haut bewirken.

Es ist davon auszugehen, daß exogene (Irritationen, entzündliche Reaktionen der Haut) und endogene Störungen (Hormone) ebenfalls die Barrierefunktion der Haut beeinträchtigen können.

Bestimmte Substanzen werden bereits in der Hornschicht adsorbiert. Adsorption beschreibt die physikochemische Anlagerung von Substanzen (z.B. Adsorption an Keratin, Melanin etc.)

In den anderen Schichten der Epidermis kann ebenfalls eine Fixierung an epidermalen Strukturen erfolgen (z.B. an Schwermetalle). Es ist auch eine Metabolisierung eindringender Substanzen zu berücksichtigen.

b) Permeation durch die Hautanhangsgebilde

In der initialen Phase der Permeation eines Externums spielt vor Sättigung der Epidermis der Durchtritt durch die Hautanhangsgebilde eine große Rolle (56), da zu diesem Zeitpunkt die Permeation durch diese Strukturen schneller erfolgt als durch die Hornschicht.

Nachdem die Sättigung der Epidermis mit dem Externum erreicht ist, permeieren die meisten Substanzen sowohl über den transepidermalen als auch über den follikulären Weg. Es stellt sich ein "steady state" bei diesen Diffusionsarten ein. Da jedoch die Diffusionsfläche der Hautanhangsgebilde im Vergleich zur Hautfläche relativ gering ist, dominiert quantitativ die transepidermale Resorption.

An stark behaarten Körperstellen oder bei schlechtem Durchtritt eines Wirkstoffes (z.B. Elektrolyte) durch die Hornschicht kann die Diffusion durch die Hautanhangsgebilde jedoch von großer Bedeutung sein.

c) Resorption in das Gefäß- und Lymphsystem

Für die Resorption ist die Durchblutung des Gewebes, nachdem sich der "steady state" eingestellt hat, eine entscheidende Voraussetzung. So kann die resorbierte Substanzmenge durch ein Erythem (hervorgerufen z.B. durch UV-Strahlung, Nikotinsäurebenzylester, Dermatitis) wesentlich erhöht werden. Die Konzentration der Substanz im Blut ist abhängig von Diffusionsgeschwindigkeit, aktiven Transportmechanismen, Verteilung im Gewebe und Metabolisierung. Die resorbierte Substanz kann sowohl als Nativmolekül als auch nach Metabolisierung durch Harn, Kot, Schweiß oder Talg (das resorbierte Material wird der Haut wieder auf dem Blutweg angeboten) ausgeschieden werden.

A.4 Perkutane Resorption von Blutegelwirkstoffen

Nach Resorptionsstudien von MARKWARDT (36) wurden im 24-Stunden-Harn der Versuchstiere (Kaninchen) 70 - 80 % der intravenös oder subkutan injizierten Hirudinmenge wiedergefunden. Das im Harn ausgeschiedene Hirudin zeigte unverändertes elektrophoretisches Verhalten und unveränderte Hemmaktivität gegenüber Thrombin; es kann deshalb angenommen werden, daß es in nativer Form ausgeschieden wurde.

A.4.1 In vivo- und in vitro-Studien am Meerschweinchen mit Hirudin, Eglin und Bdellin (64)

Diese Arbeit hatte das Ziel, am Tiermodell den Nachweis der Resorption von in Blutegelextrakt enthaltenen Proteinase-Inhibitoren (Blutegelwirkstoffen) aus Salben durch die intakte Haut zu erbringen.

Der Nachweis erfolgte über die Bildung und Detektion von spezifischen IgE-Antikörpern in der Haut nach topischer Applikation der Blutegelsalbe mittels immunologischer Verfahren, wie dem Direkten Hauttest und der Passiven Cutanen Anaphylaxie. Das positive Ergebnis dieser Experimente basiert auf dem Kriterium, daß die Bildung von IgE-Antikörpern in den eingeschmierten Tieren nur möglich ist, wenn die Substanzen durch die Hornschicht permeiert sind.

A.4.2 In vitro-Versuche an der isolierten Schweinehaut mit Hirudin und Eglin (16)

Mit Hilfe des Resorptionsmodells nach Stricker (FA. SARTORIUS) wurde die transkutane Permeation der Inhibitoren Eglin und Hirudin durch die isolierte Schweinehaut demonstriert. Der Nachweis der biologischen Aktivität von Eglin und Hirudin erfolgte über ihre Hemmaktivität gegen Chymotrypsin bzw. Thrombin. Die genaue Versuchbeschreibung findet sich unter Abschnitt B.3 und B.6. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß Hirudin und Eglin durch die isolierte Schweinehaut als biologisch aktive Inhibitoren permeieren.

A.5 Aufgabenstellung

Ziel meiner Arbeit war es, im Tiermodell die Resorption der Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin in biologisch aktiver Form nachzuweisen.

Da die zu erwartenden geringen Mengen an resorbierten Inhibitoren in Plasma und Urin der Versuchstiere unter der Nachweisgrenze eines Enzymassays liegen, war für die Durchführung dieser Arbeit die Entwicklung eines genügend empfindlichen Testsystems Voraussetzung.

In in vitro-Versuchen sollte vorab überprüft werden, ob die Ergebnisse der Enzymhemmaktivitätsmessungen von CH. GASTEIGER (16) auch für die radioaktiv markierten Inhibitoren gültig sind. In dem beschriebenen Resorptionsmodell (s. GASTEIGER) wurden ^{125}J - markierte Inhibitoren eingesetzt, und die Resorption sowohl über ihre Radioaktivität als auch über ihre biologische Aktivität (Enzymhemmung) nachgewiesen.

Schwerpunkte der Arbeit waren Resorptionsstudien an der Maus. In diesem Modell sollte der quantitative und qualitative in vivo-Resorptionsnachweis erbracht werden. Ferner wurde die Konzentrationsabhängigkeit, die Zeitabhängigkeit, die Verteilung der resorbierten Radioaktivität im Körper und der Metabolismus der applizierten Inhibitoren untersucht.

B MATERIAL UND METHODEN

B.1 Substanzen

B.1.1 Enzyme

- Thrombin: a) Test-Thrombin vom Rind; 30 IU/Tube; Behringwerke, Marburg

  b) Topostasin^{R}; Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach - Wyhlen

- Chymotrypsin: Novo Industrie GmbH (Art. Nr. 75 76 00)

B.1.2 Substrate

Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (Art. Nr. 109 410) und Chromozym^{R} TH (Art. Nr. 199 664), Boehringer Mannheim GmbH.

B.1.3 Blutegelrohextrakt; Plantorgan, Bad Zwischenahn

Durch Acetonfällung wird aus medizinischen Blutegeln Rohextrakt gewonnen, der auf Antithrombin-Einheiten standardisiert wird. Rohextrakt (IA 2506; VA 2104; GA 2306): 90 000 bis 140 000 ATE/g.

B.1.4 Salben

Salben mit Blutegelextrakt

a) Exhirud^{R} Salbe, 5 ATE/g Salbengrundlage;
diese Blutegelsalbe befindet sich im Handel.

b) Exhirud forte, 500 ATE/g;
diese Salbe stellt eine spezielle Zubereitung für die durchgeführten Experimente dar.

Enthaarungscreme; Veet, Länger & Fischer GmbH

B.1.5 Materialien für die Säulenchromatographie

Sephadex G-75 medium (Art. 9065) Pharmacia, Uppsala, Schweden; alle übrigen Substanzen waren vom höchsten, im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

B.2 Apparate

Photometer

Enzymmessungen bei 405 nm: Photometer 1101 M von Eppendorf, Hamburg, mit Rechner 6432; Drucker Typ 024 - EA von Kienzle, Villingen

Säulenchromatographie

- LKB UVICORD TYPE 4701 A, LKB (Bromma, Schweden)
- Schreiber: TYP 6520 A, LKB
- FRAKTION Collector 2112 REDIRAC, LKB
- PERISTALTIC PUMP 10 200 PERPEX^{R}, LKB

Gamma Counter

Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit dem Automatic Gamma Counting System W + W elektronic MR 1032 durchgeführt; Schreiber: Teletyp, Kontron

Zentrifugen

Tischzentrifugen: Centrifuge 211, Bio Dynamice Inc (Indianapolis, USA) und Eppendorf Zentrifuge 3 200, Eppendorf

Schermaschine

Aesculap favorita II, Typ GT 104/GH 204 mit Scherkopf GH 700 1/20 mm, Aesculap (Tuttlingen)

B.3 Enzym- und Hemmtests

Sowohl Thrombin als auch Chymotrypsin werden über ihre amidolytische Aktivität gegenüber synthetischen Peptidsubstraten (p-Nitroanilin-Freisetzung) gemessen.

B.3.1 Thrombintest mit Chromozym TH und Thrombinhemmtest (11, 80, 74)

Testprinzip

Thrombin katalysiert die Freisetzung des gelben Produktes p-Nitroanilin (pNA) aus dem farblosen synthetischen Peptidsubstrat Chromozym TH (Tos/Gly-Pro-Arg-pNA-HCl). Das pro Minute freigesetzte pNA ist proportional der Thrombinaktivität im Bestimmungsansatz.

Testdurchführung

Substrat: Inhalt einer Flasche Chromozym^{R} TH in 10 ml aqua dest. lösen

Enzym: Inhalt eines Fläschchens Test - Thrombin (30 IU/ml; Behring) in 6 ml Phosphatpuffer (0,25 M; pH 6,5) lösen.

Puffer: 0,1 M TRA / 0,2 M NaCl / 0,05 % Triton, pH 8,4

Nach 5 min langer Inkubation von 0,02 ml Thrombin, (0,98-x)ml TRA-Puffer und x ml Probenlösung (Hirudin) wird die Reaktion durch Zugabe von 0,125 ml Chymotrypsin TH gestartet. Die Testtemperatur beträgt 25° C. Die Freisetzung des pNA wird bei 405 nm über 10 min verfolgt. Der Inhibitorgehalt wird aus der Differenz des Ansatzes ohne Inhibitor (Enzymbezugswert) zum Hemmansatz berechnet.

Die Nachweisgrenze des Chromozym-Tests für Hirudin liegt bei 0,8 ATE/ml bzw. 26,4 mIU/ml.

Definition von Enzym-Einheit und NIH-Einheit

Eine Enzym-Einheit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Substrat (z.B. Chromozym TH) in einer Minute unter den festgelegten Bedingungen hydrolysiert.

NIH-Einheiten beziehen sich auf die proteolytische Aktivität von Thrombin gegenüber seinem natürlichen Substrat Fibrinogen. Gemäß der Definition des amerikanischen National Institutes of Health (Division of Biologic Standards) ist eine NIH-Einheit diejenige Menge Thrombin, die 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 sec bei 28° C zu koagulieren im Stande ist (36).

Die Komplexierung von Thrombin mit Hirudin erfolgt im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Somit kann die Aktivität von Hirudin entweder in Antithrombin-Einheiten (ATE) angegeben werden, wobei eine ATE derjenigen Menge Hirudin entspricht, die eine NIH-Einheit Thrombin hemmt (36) oder in IU, die derjenigen Menge Hirudin entspricht, die eine U Thrombin inhibiert.

B.3.2 Chymotrypsintest mit Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (Suc-Phe-pNA) und Chymotrypsinhemmtest

Testdurchführung

Substrat: 5 mg Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid werden in 1ml Puffer gelöst.

Enzym: 5 mg Chymotrypsin werden in 25 ml 0,0025 n HCl gelöst.

Puffer: 0,2 M TRA / 0,05 M $CaCl_2$, pH 7,8

Nach 5 min langer Inkubation von 0,1 ml Chymotrypsin, (1,9-x)ml TRA-Puffer und x ml Probenlösung (Eglin) wird die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Substratlösung (Suc-Phe-pNA) gestartet. Die Testtemperatur beträgt 25° C. Die Freisetzung des pNA wird bei 405 nm über 30 min verfolgt. Der Inhibitorgehalt wird aus der Differenz des Ansatzes ohne Inhibitor (Enzymbezugswert) zum Hemmansatz berechnet.

Die Nachweisgrenze des Suc-Phe-pNA-Tests für Eglin liegt bei 0,2 mIU/ml.

Die Einheit der Enzymaktivität wird in U, die der Enzymhemmaktivität in IU angegeben (siehe B.3.1, S. 24).

B.4 Konzentrierung der Inhibitorlösung

Zur Konzentrierung verdünnter Inhibitorlösungen wurde eine Kollodiumhülse (Sartorius Membranfilter SM 13 200) verwendet (Abb. 5), die in eine Saugflasche eingepaßt und an ein Vakuumsystem angeschlossen wurde.

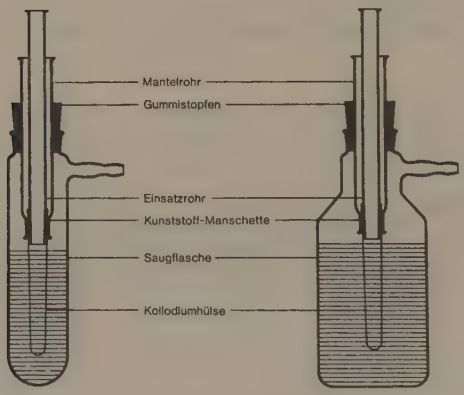

Abb. 5 Konzentrierung von Inhibitorlösungen mittels Kollodiumhülse in einer Vakuumkammer

Prinzip: Die Kollodiumhülse ist durchlässig für Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 12 400. Um den Inhibitor in der Kollodiumhülse zurückzuhalten, wird er vor dem Konzentrierungsschritt mit dem entsprechenden Enzym komplexiert. Damit erhöht sich sein Molekulargewicht von 7 000 (Hirudin) bzw. 8 000 (Eglin) auf 43 000 (Hirudin-Thrombin-Komplex) bzw. 33 000 (Eglin-Chymotrypsin-Komplex). Ggfs. wird der Inhibitor aus dem Komplex durch entsprechende Behandlung (H^+) wieder freigesetzt.

B.5 Gelchromatographische Auftrennung der radioaktiv markierten Inhibitoren nach Komplexierung mit Thrombin bzw. Chymotrypsin

B.5.1 Radioaktive Markierung von Hirudin und Eglin

Die Reinsubstanzen Hirudin (8, 9) und Eglin (60, 61, 62) wurden mit ^{125}J mittels der Jodogen-Methode markiert (13). Die erzielten spezifischen Aktivitäten lagen bei 44×10^6 cpm/µg.

B.5.2 Gelchromatographie an Sephadex G-75

Chromatographiebedingungen:

Säule: 2,3 x 30 cm; Matrix: Sephadex G-75 medium;
Elutionspuffer: 0,15 M NH_4HCO_3, pH 7,7
Durchflußgeschwindigkeit: 8,5 ml/h; Fraktionsvolumen: 0,85 ml;
Die Eichung erfolgte mit jeweils 1 mg Ovalbumin (MG = 43 000), Chymotrypsinogen (MG = 25 000) und Aprotinin (Trasylol) (MG = 6 500).

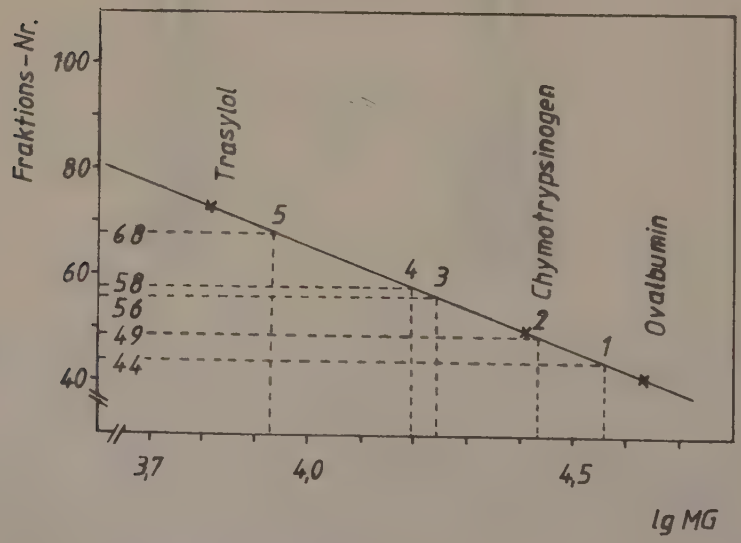

Abb. 6 Eichung der Sephadex G-75 Säule zur Bestimmung der Molekulargewichte der Elutionsfraktionen von Hirudin, Eglin und deren Komplexen

Aus der Eichgeraden waren folgende Molekulargewichte ablesbar:

1	Hirudin-Thrombin-Komplex:	37 000
2	Eglin-Chymotrypsin-Komplex:	27 500
3	Eglin-Dimer:	17 600
4	Hirudin-Dimer:	15 500
5	Eglin:	8 700

B.5.3 Gelchromatographische Detektion von Hirudin

Hirudin

Frisch markiertes ^{125}J-Hirudin ($1{,}5 \times 10^6$ cpm ≙ 0,0225 IU) wurde gemeinsam mit nativem, unmarkiertem Hirudin (12,5 IU) auf die Sephadex G-75 Säule aufgetragen und entsprechend den Bedingungen, die in B.5.2 beschrieben sind, chromatographiert. In den Säuleneluaten wurden sodann die Radioaktivität und Thrombinhemmaktivität (Chromozym TH-Test) gemessen.

Hirudin-Thrombin-Komplex

Hirudin (9,4 IU) und ^{125} J-markiertes Hirudin (190 000 cpm ≙ 0,003 IU) wurden mit Überschuß an Thrombin (17,1 U) in einem Volumen von 1 ml 5 min inkubiert, der Reaktionsansatz anschließend auf die Sephadex G-75 Säule aufgetragen und chromatographiert (vgl. B.5.2). In den Säuleneluaten wurde die Thrombinaktivität und die Radioaktivität gemessen.

Aus dem Komples freigesetztes Hirudin

Ein entsprechend B.5.3 isolierter Hirudin-Thrombin-Komplex wurde 15 min auf 80° C erhitzt und anschließend entsprechend B.5.2 chromatographiert.

B.5.4 Gelchromatographische Detektion von Eglin

Eglin

Frisch markiertes ^{125}J-Eglin ($1{,}1 \times 10^{6}$ cpm ≙ $3{,}75 \times 10^{-3}$ mIU) wurde gemeinsam mit nativem, unmarkiertem Eglin (300 mIU) auf die Sephadex G-75 Säule aufgetragen und entsprechend wie unter B.5.2 beschrieben chromatographiert. In den Eluaten wurden sowohl die Radioaktivität als auch die Chymotrypsinhemmaktivität (Substrat: Suc-Phe-pNA) gemessen.

Eglin-Chymotrypsin-Komplex

Eglin (116 mIU) und ^{125}J-markiertes Eglin (580 000 cpm ≙ $1{,}98 \times 10^{-3}$ mIU) wurden mit Überschuß von Chymotrypsin (15 mg ≙ 675 mU) in einem Volumen von 1 ml 5 min inkubiert, der Reaktionsansatz anschließend auf die Sephadex G-75 Säule aufgetragen und chromatographiert (vgl. B.5.2). In den Säuleneluaten wurden die Chymotrypsinaktivität und die Radioaktivität gemessen.

B.6 In vitro-Resorptionsversuche an der isolierten Schweinehaut

B.6.1 Resorptionsmodell nach Stricker (Sartorius Membranfilter)

Für die in vitro-Resorptionsversuche aus Blutegel-Rohextraktlösungen wurde das Resorptionsmodell nach Stricker von der Fa. Sartorius verwendet.

Als Diffusionszellen fungieren zwei Kammersysteme. Die Austauschfläche zwischen diesen beiden Kammern beträgt 40 cm² und enthält als Membran eine präparierte Schweinehaut.

Jede Kammer steht mit der Austauschfläche über Silikonschläuche in Verbindung. Eine Rollerpumpe sorgt für einen ständigen Kreislauf zwischen Kammer und Austauschfläche. Die Fördergeschwindigkeit der Pumpe beträgt 10 - 15 ml/min. Der Temperiermantel gewährleistet eine konstante Temperatur. Magnetrührstäbe durchmischen die Lösungen in den Kammern.

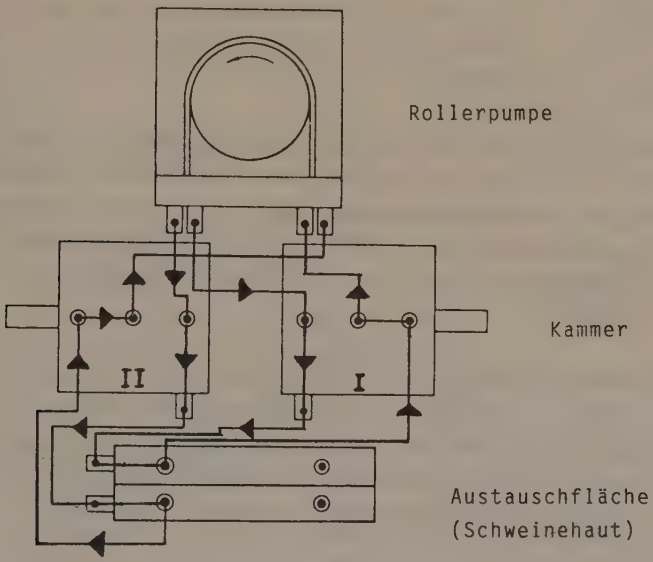

Abb. 7 Resorptionsmodell nach Stricker

Kammer I hat Kontakt mit der Außenseite der Haut; sie ist die Probenkammer

Kammer II hat Kontakt mit der Hautinnenseite; sie enthält die permeierten Substanzen

B.6.2 Schweinehaut

Für alle in vitro-Versuche mit dem Resorptionsmodell nach Stricker wurde Schweinehaut verwendet.

Die Schweinehaut wurde von frischgeschlachteten Schweinen (Schlachthof München) entnommen. Besonders geeignet ist die Schenkelinnenseite, da hier die Haut dünner ist. Die Haut darf nicht maschinell abgezogen werden, sondern muß mit dem Messer per Hand abgetrennt werden.

Die Schweine wurden vor der Schlachtung abgebrüht und rasiert, daher mußte darauf geachtet werden, daß die entnommenen Hautproben frei von Verletzungen waren. Der Transport der Haut erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur. Mit einer Schere wurden Reste des Unterhautfettgewebes sorgfältig abpräpariert.

Die präparierte Haut wurde passend zurechtgeschnitten und in den Membranhalter eingespannt. In den Spalt zwischen den beiden Membranhalter-Platten wurde Nipasept als Antiseptikum eingestreut. Der Spalt wurde dann mit Klebeband verschlossen. Die Öffnungen für die Schlauchanschlüsse wurden freigelassen.

Die Lagerung der Haut erfolgte im Kühlschrank bei +4° C für höchstens 1 Tag.

B.6.3 Allgemeine Versuchsdurchführung bei der in vitro-Resorption

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte analog zu denen von CH. GASTEIGER (16). Als Membran für die Resorptionsversuche wurde frische Schweinehaut verwendet, deren Dicke nach Abpräparation des subkutanen Fettgewebes ca. 2 mm betrug. Die Austauschfläche der Kammer war 40 cm^2 (s. B.6.1 und B.6.2).

Im Resorptionsmodell nach Stricker existieren zwei Kreislaufsysteme, von denen System I den die Hautaußenseite umspülenden Blutegel-Rohextrakt zusammen mit den markierten Inhibitoren enthält.

Tabelle 2: Lösungen im Kreislaufsystem I und II der Sartorius-Resortionsapparatur

System I	System II
0,9 % NaCl	0,9 % NaCl
0,001 M NaH_2PO_4	0,001 M NaH_2PO_4
0,02 M Natriumazid	0,02 M Natriumazid
500 mg Rohextrakt	
10 - 20 x 10^6 cpm ^{125}J-Hirudin bzw. ^{125}J-Eglin	
in 100 ml Endvolumen pH 7,4	in 100 ml Endvolumen pH 7,4
Testtemperatur: 37° C ± 1° C	

Alle Versuche liefen über 48 Stunden, wobei nach 24 und nach 48 Stunden jeweils die durch die Schweinehaut diffundierte Enzymhemmaktivität und Radioaktivität gemessen wurde. Für diese Bestimmungen wurden aliquote Proben aus System II entnommen; das Volumen des Systems wurde mit physiologischer Kochsalzlösung wieder auf 100 ml aufgefüllt.

Hirudin

Die Lösung von 500 mg Blutegel-Rohextrakt in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung hatte eine Thrombinhemmaktivität von 11,60 IU/ml (1. Versuch) bzw. 11,78 IU/ml (2. Versuch). Hierzu wurden im 1. Versuch 13 165 000 cpm und im 2. Versuch 13 894 500 cpm ^{125}J-Hirudin zugesetzt.

Die Messung der penetrierten Radioaktivität in Kammer II erfolgte mittels eines Gamma-Counters. Die biologische Aktivität wurde über die Thrombinhemmaktivität bestimmt.

Eglin

Die Lösung des Blutegel-Rohextraktes (500 mg/100 ml physiologische NaCl in Kammer I) hatte eine Chymotrypsinhemmaktivität von 30,00 mIU/ml (1. Versuch) bzw. 31,00 mIU/ml (2. Versuch). Die Lösung wurde im 1. Versuch mit 17 569 000 cpm und im 2. Versuch mit 15 960 000 cpm ^{125}J-Eglin versetzt.

Die Messung der permeierten Radioaktivität in Kammer II wurde mit dem Gamma-Counter durchgeführt. Die Chymotrypsinhemmaktivitätsmessung erfolgte mit Hilfe des Substrates Suc-Phe-pNA.

B.7 In vivo-Resorptionsversuche an der Maus

B.7.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

Versuchstiere

Die Experimente wurden an weiblichen Mäusen (NMRI Stamm) mit einem Gewicht von durchschnittlich 30 g durchgeführt. Männliche Tiere sind ungeeignet, da deren Rücken von Bißwunden übersät sind. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem offenen System unter klimatisierten Bedingungen (20° C $\pm$ 1° C, relative Luftfeuchte 55 % $\pm$ 5 %). Die Versuchstiere erhielten pelletiertes Fertigfutter (Fa. Altrumin, Lager Westfalen) und Trinkwasser ad libitum. Die Züchtung und Aufzucht wurde im hauseigenen Tierlabor durchgeführt.

Enthaarung

Die mittels Äthernarkose betäubten Mäuse wurden mit einer Schermaschine am gesamten Rücken geschoren. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Enthaarungscreme (Veet). War die Haut verletzt oder bestand eine allergische Reaktion auf die Enthaarungscreme, so schieden diese Tiere für die Experimente aus. Zwischen Scherung und Experimentbeginn lag ein Zeitraum von 1 - 24 Stunden.

Salbenzubereitung

Unterschiedliche Mengen von radioaktiv markiertem Hirudin bzw. Eglin wurden als Lösungen in einer Schale in 1 Gramm Blutegelsalbe (Exhirud forte; 500 ATE/g Salbengrundlage) eingearbeitet. Die Durchmischung erfolgte mit einem Mörser unter portionsweiser Zugabe der Salbe.

Behandlung der Mäuse mit Salbe

Die Salbe wurde innerhalb 1 Stunde durch 3 Schmierungen auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert. Zum Schutz der eigenen Hände vor den radioaktiven Substanzen wurden pro Hand 2 Einmalhandschuhe aus Latex verwendet. Die mit Salbe eingeschmierten Mäuse wurden sodann in eine selbstgebaute Kammer (2 Plastikgefäße) gesteckt, in der es ihnen unmöglich war, die Salbe per os zu sich zu nehmen (Abb. 8).

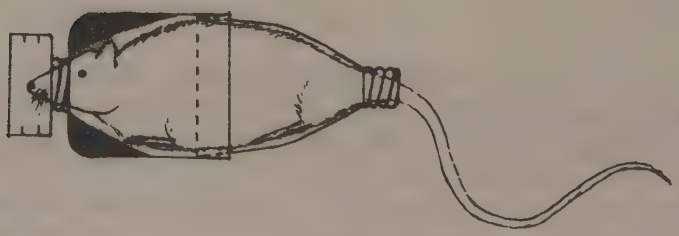

Abb. 8 Verwendete Kammer zur Haltung der Mäuse während der Versuchsdauer

Mit Hilfe von Kunststoffautopolymerisat (Paladur^{R}) wurde die Innenfläche der Kammer der anatomischen Körperform angepaßt.

Blutentnahme und Probenaufbereitung

Nach Äthernarkose erfolgte die retroorbitale Blutentnahme tröpfchenweise mit Glaskapillaren (aus Sodaglas, Außendurchmesser 1,00 mm, Wanddurchmesser 0,10 mm, Artikel-Nr. 1412217).

Mit dieser Methode konnten zwischen 0,5 und 1,5 ml Blut gewonnen werden. In diesen Vollblutproben wurde die Radioaktivität gemessen und zum Zwecke des Konzentrationsvergleichs auf 1 ml Blutvolumen hochgerechnet.

Das Gesamtblutvolumen der Maus beträgt ungefähr 4 ml.

Für den Nachweis biologisch aktiver Inhibitoren wurden die Seren (gewonnen nach Koagulation und Zentrifugieren der Blutproben) von mehreren Mäusen vereinigt, mit Enzym (Thrombin bzw. Chymotrypsin) versetzt, die Mischung 5 min inkubiert und anschließend gelchromatographisch aufgetrennt (vgl. B.5.3 und B.5.4). Der Pool der gesammelten Seren sollte eine Radioaktivität von 50 000 cpm nicht unterschreiten.

Uringewinnung und Probenaufbereitung

Die Uringewinnung stellte anfangs ein großes Problem dar, da die Mäuse nicht zu katheterisieren waren.

a) Gewinnung mit Hilfe einer Injektionsspritze:

Nach Tötung der Mäuse erschlafft die Blasensphinctermuskulatur und der Urin kann ausgepreßt und abgesaugt werden. Mit dieser Methode konnten zwischen 0 und 100 µl Urin gewonnen werden.

Es wurde die Radioaktivität in den Einzelurinen bestimmt.

Zum Nachweis der biologisch aktiven Inhibitoren wurde der Urin von mehreren Tieren vereinigt, mit Enzym versetzt, die Mischung 5 min inkubiert und dann gelchromatographisch aufgetrennt (vgl. B.5.3 und B.5.4). Die Anzahl der gepoolten Urinproben wurde abhängig gemacht von der Radioaktivität im Urin; für die gelchromatographische Auftrennung sollte eine Radioaktivität von 50 000 cpm nicht unterschritten werden.

b) Gewinnung mit Hilfe eines Stoffwechselkäfigs:

Der 24-Stunden Urin wurde von Mäusen gewonnen, die über den gesamten Zeitraum im Stoffwechselkäfig gehalten wurden. Der unter diesen Versuchbedingungen gesammelte Urin war unvermeidbar mit Kot versetzt. Die Radioaktivität dieses Urin-Kot-Gemisches wurde gemessen.

Der Nachweis von biologisch aktiven Inhibitoren erfolgte nach Abfiltrieren der festen Kotbestandteile und Zugabe von Enzym zur klaren Urinlösung. Nach 5 min Inkubation erfolgte die gelchromatographische Auftrennung (vgl. B.5.3 und B.5.4).

B.7.2 Konzentration der Radioaktivität (*Aktivitätskonzentration) im Blut in Abhängigkeit von der applizierten Radioaktivitätsmenge

Die Salbe wurde wie unter B.7.1 beschrieben auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert.

Es kamen 3 verschiedene *Aktivitätskonzentrationen von markiertem Hirudin bzw. Eglin zur Anwendung: 10×10^6 / 20×10^6 / 30×10^6 cpm/g Salbe (Exhirud forte, 500 ATE/g). Der Versuch mit den *Aktivitätskonzentrationen von 10×10^6 und 30×10^6 cpm/g wurde zweimal, der mit 20×10^6 cpm/g wurde 10 mal durchgeführt. Für die Auswertung wurden Mittelwerte erstellt.

Die Mäuse waren während der Versuchsdauer in der bereits beschriebenen Kammer eingeschlossen (vgl. B.7.1). Die retroorbitale Blutentnahme erfolgte 1 h nach der letzten Schmierung, d.h. 2 h nach der ersten Schmierung.

B.7.3 Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption

1 g Exhirudsalbe (500 ATE/g), versetzt mit 20 x 10^6 cpm ^{125}J-Eglin bzw. ^{125}J-Hirudin, wurde innerhalb 1 Stunde in 3 Schmierungen auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert. Die Tiere wurden danach in eine Kammer eingeschlossen (vgl. B.7.1).

Die Blutentnahmen erfolgten zum Zeitpunkt 0 (letzte Schmierung) bzw. 1, 2, 3, 4 und 24 h nach der letzten Schmierung.

In den gewonnenen Blutproben wurde die Radioaktivität bestimmt.

B.7.4 Quantitative Bestimmung von ^{125}J-markiertem Hirudin und Eglin im 24 Stunden-Urin nach Salbenapplikation

Die Salbenapplikation erfolgte wie unter B.7.1 beschrieben. Die Menge an zugesetzter Radioaktivität betrug jeweils 20 x 10^6 cpm.

Der 24 Stunden-Urin wurde in einem Stoffwechselkäfig gesammelt. Die Mäuse wurden hierzu nicht in der beschriebenen Kammer gehalten, sondern sie wurden durch eine "Halskrause" (durchbohrter Kunststoffdeckel) daran gehindert, sich abzuschlecken. Es wurden für Eglin und Hirudin je 5 Versuche durchgeführt.

In den Urinproben, die mit Kot verunreinigt waren, wurde die Radioaktivität bestimmt.

Der Nachweis von biologisch aktiven Inhibitoren im 24 h-Urin erfolgt wie unter B.7.1 b) beschrieben.

B.7.5 Verteilung der Radioaktivität nach Resorption von ^{125}J-markiertem Hirudin und Eglin in Blut, Urin und in den Organen der Maus.

Die Schmierung der Mäuse erfolgte wie unter B.7.1 beschrieben. Die beigegebene Radioaktivitätsmenge betrug jeweils 20×10^6 cpm.

1 h nach der letzten Schmierung erfolgte zuerst die retroorbitale Blutabnahme unter Äthernarkose, dann die Urinabnahme mittels Injektionsspritze nach Tötung der Tiere, und schließlich die Organentnahme.

In Vollblut, Urin und in den Organen wurde die Radioaktivität bestimmt.

C ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, die in vitro an excidierter Schweinehaut beobachtbare perkutane Resorption von Hirudin und Eglin (16) durch ein in vivo-Modell an der Maus zu untermauern.

Da infolge der in einer früheren Studie gewonnenen Erfahrung anzunehmen war, daß die in vivo resorbierte Inhibitormenge in Blut und Urin nur gering sein würde (64) und deshalb die Anwendung eines Enzymhemmtests nicht möglich war, wurde für diese Studie ein neuer Assay zum Nachweis der biologisch aktiven Inhibitoren Hirudin und Eglin entwickelt. Hirudin und Eglin wurden mit ^{125}J markiert und über ihre Radioaktivität detektiert. Da die alleinige Messung der Radioaktivität keine Aussage über die Intaktheit der Inhibitormoleküle gestattet, erfolgte der Nachweis der biologischen Aktivität über die Fähigkeit der Inhibitoren, mit geeigneten Proteinasen Komplexe zu bilden. Die quantitative Bestimmung von komplexiertem und unkomplexiertem Inhibitor erfolgte mittels Gelfiltration, die eine Differenzierung der nativen Inhibitoren und ihrer Komplexe über die unterschiedlichen Molekulargewichte erlaubt (Hirudin 7 000, Hirudin-Thrombin-Komplex 43 000; Eglin 8 100; Eglin-Chymotrypsin-Komplex 33 000). Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde im in vitro-Resorptionsversuch an der isolierten Schweinehaut überprüft.

C.1 In vitro-Versuche

Es wurde die Permeation der Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin durch die isolierte Schweinehaut im Resorptionsmodell nach Stricker untersucht.

Die Versuche wurden analog den Angaben von CH. GASTEIGER (16) mit Enzymhemmtests durchgeführt. Zusätzlich kamen Radioaktivitätsmessungen zur Anwendung.

Die Detektion von Hirudin und Eglin erfolgte über die:

1) Hemmaktivität (Tabelle 3 und 4),

2) Radioaktivität (Tabelle 3 und 4),

3) Gelchromatographie der Komplexe nach Inkubation der Inhibitoren mit Thrombin bzw. Chymotrypsin (Abb. 9 bis 13).

In 100 ml Blutegel-Extraktlösung (500 mg Rohextrakt) konnten durchschnittlich 1 170 IU Hirudin (Tab. 3) bzw. 3 050 mIU Eglin (Tab. 4) gemessen werden. Dies entspricht für Hirudin 35 450 ATE (1 ATE ≙ 33 mIU Hirudin). Auf eine Extraktmenge, die 1 ATE Hirudin enthält, entfallen demnach 0,086 mIU Eglin.

Es gelten folgende Beziehungen:

Hirudin	1 mg	≙	20 000 ATE	≙ 660 IU	(Thrombinhemmung)
Eglin	1 mg	≙	0,15 IU		(Chymotrypsinhemmung)

Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der realen Haut-Permeationsrate (HPR) und der Standard-Haut-Permeationsrate (SHPR).

Die reale Haut-Permeationsrate HPR ist die aus einer Lösung, Salbe, Creme oder einem Gel durch die Epidermis in der Zeit t [h] hindurchgetretene Substanzmenge M (t), die auf die Flächeneinheit A der behandelten Hautoberfläche und auf die Zeitdauer der Einwirkung dt bezogen wird. Man beschreibt damit den Massenfluß eines Stoffes.

Die Standard-Haut-Permeationsrate SHPR ist der Quotient aus der realen Haut-Permeationsrate HPR und der Konzentration Δc der zu untersuchenden Substanz (z.B. Hirudin, Eglin) in einer Lösung, Salbe, Creme oder einem Gel (48).

Es gelten folgende Beziehungen:

Haut-Permeation HP zu einem bestimmten Zeitpunkt t [h]

$$HP_t = \frac{M(t)}{A} \qquad \left[\frac{x}{cm^2}\right] \qquad x = \text{cpm; IU; g usw.}$$

Haut-Permeationsrate HPR

$$HPR = \frac{M(t)}{dt \cdot A} \qquad \left[\frac{x}{h \cdot cm^2}\right]$$

Standard-Haut-Permeation SHP zu einem bestimmten Zeitpunkt t [h]

$$SHP_t = \frac{HP}{\Delta c} \qquad \left[\frac{1 \text{ bzw. } g}{cm^2}\right]$$

Standard-Haut-Permeationsrate SHPR

$$SHPR = \frac{HPR}{\Delta c} \qquad \left[\frac{1 \text{ bzw. } g}{h \cdot cm^2}\right]$$

Tabelle 3: Hirudinpermeation durch die isolierte Schweinehaut (Austauschfläche von 40 cm²)

Eingesetzte Radioaktivität bzw. Inhibitormenge in 100 ml	Permeation nach 24 h		Permeation nach 48 h		Zwischen 24 und 48 h	
	HP_{24} $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. IU}}{40\ cm^2}\right]$	SHP_{24} $\left[\frac{ml}{40\ cm^2}\right]$ bzw. %	HP_{48} $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. IU}}{40\ cm^2}\right]$	SHP_{48} $\left[\frac{ml}{40\ cm^2}\right]$ bzw. %	HPR $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. IU}}{h \cdot cm^2}\right]$	SHPR $\left[\frac{\mu l}{h \cdot cm^2}\right]$
1. Versuch						
Radioaktivität (13 165 000 cpm)	503 000*	3,8	1 100 000*	8,4	622*	4,72
Thrombinhemm-aktivität (1 160 IU)	22,0	1,9	54,3	4,7	0,0336	2,9
2. Versuch						
Radioaktivität (13 894 500 cpm)	660 000*	4,8	1 296 000*	9,3	663*	4,77
Thrombinhemm-aktivität (1 178 IU)	28,4	2,4	63,4	5,4	0,0365	3,1

HP, SHP, HPR, SHPR siehe C.1, S. 43

Tabelle 4: Eglinpermeation durch die isolierte Schweinehaut (40 cm²)

Eingesetzte Radioaktivität bzw. Inhibitormenge in 100 ml	Permeation nach 24 h		Permeation nach 48 h		Zwischen 24 und 48 h	
	HP_{24} $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. mIU}}{40\ cm^2}\right]$	SHP_{24} $\left[\frac{ml}{40\ cm^2}\right]$ bzw. %	HP_{48} $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. mIU}}{40\ cm^2}\right]$	SHP_{48} $\left[\frac{ml}{40\ cm^2}\right]$ bzw. %	HPR $\left[\frac{cpm^* \text{ bzw. mIU}}{h \cdot cm^2}\right]$	SHPR $\left[\frac{\mu l}{h \cdot cm^2}\right]$
1. Versuch						
Radioaktivität (17 569 000 cpm)	728 700*	4,1	1 565 000*	8,9	871*	5,0
Chymotrypsin-hemmaktivität (3 000 mIU)	125	4,2	270	9,0	0,15	5,0
2. Versuch						
Radioaktivität (15 960 000 cpm)	687 500*	4,3	1 500 000*	9,4	846	5,3
Chymotrypsin-hemmaktivität (3 100 mIU)	135	4,4	300	9,6	0,17	5,5

HP, SHP, HPR, SHPR siehe C.1, S. 43

Zur Berechnung von HPR und SHPR wurden die Permeationswerte von 24 und 48 Stunden nach Versuchsbeginn herangezogen, da in diesem Zeitintervall die primäre Sättigung der Haut abgeschlossen ist und sich eine lineare Durchtrittsrate einstellt, d.h. es herrschte ein konstanter Massenfluß (16).

Anhand eines Beispiels soll die Berechnung veranschaulicht werden (1. Versuch: Hirudin mit Radioaktivität):

Im Zeitintervall 24 h bis 48 h (dt = 24 h) sind 597 000 cpm ^{125}J-Hirudin $\left[M(t = 24\ h)\right]$ permeiert. Die Durchtrittsfläche A beträgt 40 cm².

$$HPR = \frac{597\ 000\ cpm}{24\ h \cdot 40\ cm^2} = 622\ \left[\frac{cpm}{h \cdot cm^2}\right]$$

Die eingesetzt Inhibitormenge Δc betrug 13 165 000 $\frac{cpm}{100\ ml}$ ^{125}J-Hirudin.

$$SHPR = \frac{622\ cpm \cdot 100\ ml}{13\ 165\ 000\ cpm \cdot h \cdot cm^2} = 4{,}72\ \left[\frac{\mu l}{h \cdot cm^2}\right]$$

Die permeierte Inhibitormenge, gemessen anhand der Hemmaktivität, liegt nach 48 Stunden durchschnittlich bei 5,1 % bzw. 3 µl/h/cm² für Hirudin und für Eglin bei 9,3 % bzw. 5,3 µl/h/cm². Diese Resorptionsrate bestätigt die experimentiellen Ergebnisse von CH. GASTEIGER (16).

Bei der quantitativen Beurteilung der Radioaktivitätsmessungen ist festzustellen, daß bei Eglin eine Übereinstimmung mit der Hemmaktivität besteht; für Hirudin ergab sich der doppelte Wert für die Permeation gemessen über die Radioaktivität im Vergleich zur Hemmaktivität. Dieses Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, daß ein Abbau des Hirudins durch Hautproteasen erfolgt war. Eglin hingegen ist unter den angewendeten Bedingungen offensichtlich stabiler gegen Inaktivierung.

Es ist nun interessant, die Ergebnisse der in vivo-Schweinehaut-Resortionsversuche von H. PRATZEL (47) mit denen der eigenen in vitro-Schweinehautresorptionsversuche zu vergleichen (47).

In vivo-Versuche (H. PRATZEL): Salbe; 10,5 mg Hirudin/4g Salbe; Urinradioaktivitätsmessungen

$$\text{SHPR maximal: } 3{,}3 \frac{\mu g \text{ Salbe}}{h \cdot cm^2}$$

In vitro-Versuche (H. BRUCKBAUER): Lösung; 1,76 mg Hirudin/100ml; Radioaktivitätsmessungen

$$\text{SHPR: } 4{,}7 \frac{\mu l \text{ Lösung}}{h \cdot cm^2} \triangleq 4\,700 \frac{\mu g}{h \cdot cm^2}$$

Der Umrechnung wurde zugrunde gelegt, daß 1 µl Lösung 1 mg Gewicht hat.

Bei den in vitro-Versuchen mit Lösung ist demnach eine 1424-fache Steigerung der Standard-Haut-Permeationsrate zu beobachten. Dieses Ergebnis ist mit der optimalen Durchfeuchtung der Haut im wässrigen Milieu erklärbar.

Berechnet man die HPR auf der Basis der Hemmaktivität $\left[\frac{IU}{h \cdot cm^2}\right]$, so kann mit Hilfe der spezifischen Aktivität (Hirudin 660 IU/mg; Eglin 150 mIU/mg)der Massenfluß der Inhibitoren in mg/h/cm² angegeben werden.

Für die in vivo- bzw. in vitro-Versuche kann auch der Massenfluß (HPR) in mg Hirudin für die aufgetragene Konzentration Δc berechnet werden:

$$HPR = SHPR \cdot \Delta c$$

In vivo-Versuch (H. PRATZEL): 10,5 mg Hirudin/4 g Salbe

$$HPR = \frac{3{,}3\ \mu g\ Salbe \cdot 10{,}5\ mg\ Hirudin}{h \cdot cm^2 \cdot 4\ g\ Salbe} = 8{,}7\ \frac{ng\ Hirudin}{h \cdot cm^2}$$

In vitro-Versuch (H. BRUCKBAUER): 1,76 mg Hirudin/100 ml

$$HPR = \frac{4{,}7\ \mu l\ Lösung \cdot 1{,}76\ mg\ Hirudin}{h \cdot cm^2 \cdot 100\ ml\ Lösung} = 82{,}7\ \frac{ng\ Hirudin}{h \cdot cm^2}$$

Da der Nachweis der Inhibitoren über die Radioaktivität alleine unzureichend ist, ist der Nachweis der biologischen Aktivität unbedingt notwendig.

Hirudin bildet mit Thrombin und Eglin mit Chymotrypsin einen sabilen EI-Komplex im stöchiometrischen Verhältnis 1:1. Es ist daher möglich, diese Komplexe nach gelchromatographischer Auftrennung entsprechend den unterschiedlichen Molekulargewichten der freien und komplexierten Inhibitoren auf einer geeichten Säule zu bestimmen.

Es bestand das Problem, daß auf die Sephadex G-75 Säule nur ein Volumen von 1 ml bis maximal 3 ml aufgetragen werden konnte, um eine gute Trennung in die entsprechenden Molekulargewichtsfraktionen zu erreichen; zusätzlich mußten mindestens 50 000 cpm in diesem Volumen enthalten sein, um eindeutige Aussagen über die Radioaktivitätsverteilung machen zu können. Bei den in vitro-Versuchen war es deshalb notwendig, das Volumen der Lösung von 100 ml aus der Resorptionskammer II mittels einer Kollodiumhülse unter Vakuum einzuengen. Da die Kollodiumhülse ein Ausschlußvolumen von 12 400 Dalton hat, mußten Hirudin und Eglin vor der Konzentrierung mit Thrombin bzw. Chymotrypsin komplexiert werden. Bei dieser Einengung erfolgte gleichzeitig eine Abtrennung niedermolekularer sowie nicht mit den Enzymen reagierender Begleitsubstanzen (Inhibitorabbauprodukte etc.). Es wurde ein Verlust an Radioaktivität von 30 - 50 % gemessen, der sich auf diese Anteile und adsorbierte EI-Komplexe in der Membran der Kollodiumhülse zurückführen läßt.

Es erfolgten nun die gelchromatographischen Fraktionierungen von:

1) frisch mit ^{125}J-markierten Inhibitoren unter Zusatz von nativen, d.h. nicht markierten Inhibitoren (Abb. 9 und 12).

2) Inhibitor-Enzym-Komplexen nach Einengung in der Kollodiumhülse. Zur Komplexierung war Enzym im Überschuß zugesetzt worden (Abb. 10 und 13).

Diese beiden Chromatographien wurden für Eglin und Hirudin mit gleicher Methodik durchgeführt. Die im Folgenden beschriebene Fraktionierung wurde nur für Hirudin durchgeführt.

3) Gelchromatographie von aus dem EI-Komplex freigesetztem Hirudin (Abb. 11).

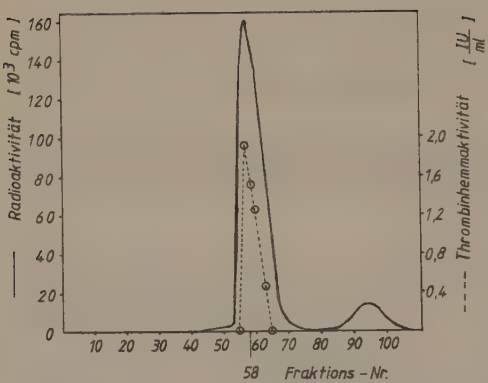

Abb. 9 Gelchromatographie von frisch markiertem ^{125}J - Hirudin
(aufgetragene Radioaktivität: 1 500 000 cpm)
(aufgetragene Hemmaktivität: 12 500 mIU)

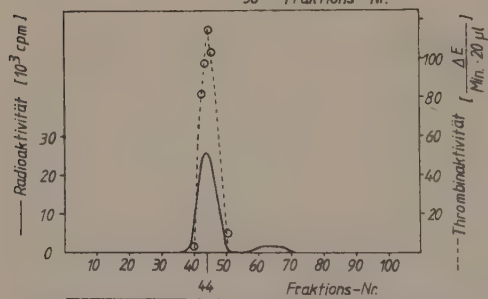

Abb.10 Gelchromatographie des Hirudin-Thrombin-Komplexes
(aufgetragene Radioaktivität: 190 000 cpm)

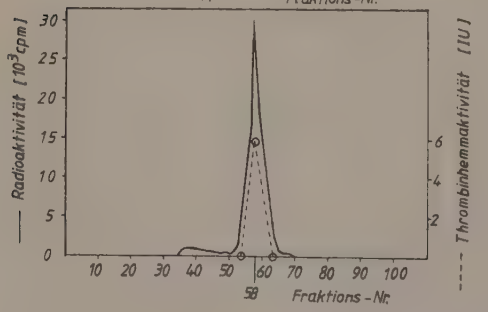

Abb.11 Gelchromatographie von Hirudin, das durch Erhitzen aus dem Hirudin-Thrombin-Komplex freigesetzt wurde
(aufgetragene Radioaktivität: 260 000 cpm)

Methodische Details sind im Abschnitt B.5.3, S. 29 beschrieben.

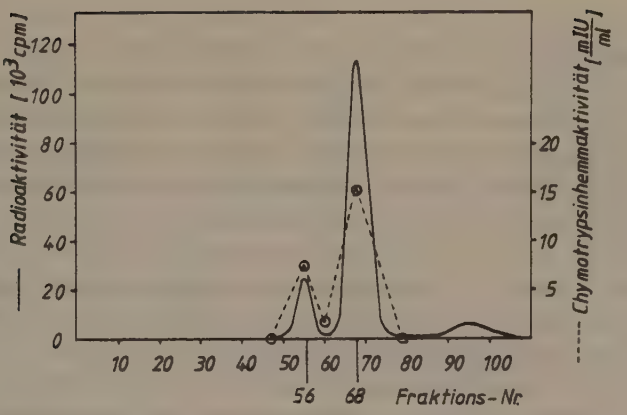

Abb. 12 Gelchromatographie von frisch mit ^{125}J markiertem Eglin
(aufgetragene Radioaktivität: 1 100 000 cpm)
(aufgetragene Hemmaktivität: 300 mIU)

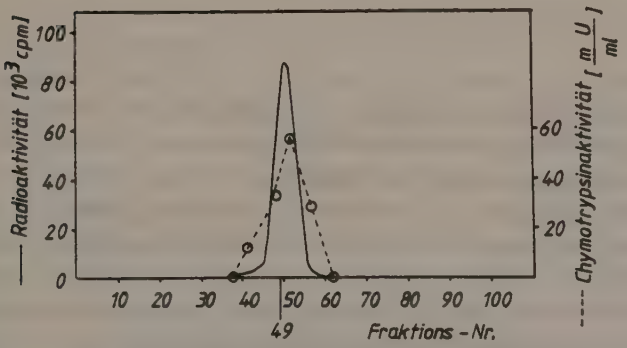

Abb. 13 Gelchromatographie des Eglin-Chymotrypsin-Komplexes
(aufgetragene Radioaktivität: 580 000 cpm)

Methodik: siehe Abschnitt B.5.4, S. 30

1) Gelchromatographie der freien Inhibitoren (Abb. 9 und 12)

Bei der Gelchromatographie von frisch markiertem plus nativem Inhibitor werden Hemmaktivität und Radioaktivität in einem Peak ko-eluiert. Hirudin erscheint in Fraktion 58 entsprechend einem Molekulargewicht von 15 500; Hirudin wird demzufolge unter den gegebenen Bedingungen als Dimer eluiert.

Eglin wird als Monomer in Fraktion 68 entsprechend einem Molekulargewicht von 8 700 und als Dimer in Fraktion 56 entsprechend einem Molekulargewicht von 17 600 eluiert.

Im Salzbereich (Fraktionen 90 - 100) fanden sich bei Hirudin 9 % und bei Eglin 5 % der aufgetragenen Radioaktivität. Dieser Fraktionsbereich könnte dem bei der Markierung nicht vollständig abgetrenntem Na ^{125}J entsprechen.

2) Gelchromatographie der Enzym-Inhibitor-Komplexe (Abb. 10 und 13)

Die Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden nach gelchromatographischer Auftrennung über die Radioaktivität detektiert. In diesen Fraktionen konnte zusätzlich Enzymaktivität gemessen werden, da Enzym im Überschuß zugesetzt worden war. Auf der verwendeten Gelpermeationssäule kann eine Trennung im Molekulargewichtsbereich von freiem Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex nicht vollständig erreicht werden, so daß Radioaktivität und Enzymaktivität ko-eluieren. Der Hirudin-Thrombin-Komplex erscheint in Fraktion 44 (Molekulargewicht 37 000), der Eglin-Chymotrypsin-Komplex in Fraktion 49 (Molekulargewicht 27 500).

Bei der Gelchromatographie des Hirudin-Thrombin-Komplexes trat im Hirudinbereich (Tubes 55 - 70) ein zusätzlicher Peak (ca. 11 %; siehe Abb. 10) auf. Zunächst wurde angenommen, daß es sich um freies Hirudin handelt, das durch Dissoziation aus dem Hirudin-Thrombin-Komplex freigesetzt wurde. J. DODT gelang es aber, diesen Fraktionsbereich abzutrennen und zu charakterisieren. Es handelt sich offensichtlich um inaktives, d.h. nicht mehr zur Komplexbildung befähigtes Hirudin.

Im Salzbereich befand sich keine Radioaktivität, da niedermolekulare Substanzen mit Molekulargewichten unter 12 400 mittels der Kollodiumhülse vor der Chromatographie abgetrennt worden waren. Diesen Beobachtungen zufolge ist es nun möglich, die Enzym-Inhibitor-Komplexe aufgrund ihrer höheren Molekulargewichte von den freien Inhibitoren zu differenzieren und zu quantifizieren.

3) Gelchromatographie des aus dem Enzym-Inhibitor-Komplex freigesetzten Hirudins (Abb. 11)

Nach 15 min Erhitzen auf 85° C kann durch Zerstörung des Thrombins Hirudin aus dem Hirudin-Thrombin-Komplex wieder freigesetzt werden. Hierzu wurden die Eluate nach Gelchromatographie des Hirudin-Thrombin-Komplexes gepooled, mit der Kollodiumhülse eingeengt, anschließend erhitzt und erneut der gelchromatographischen Trennung unterworfen. Die Rechromatographie dieser Proben ergibt ein identisches Chromatogramm wie für freies Hirudin: Radioaktivität und Hemmaktivität wurden in Fraktion 58 ko-eluiert.

Im Salzbereich konnte keine Radioaktivität bestimmt werden, da dieser Bereich bereits vor Gelchromatographie des Hirudin-Thrombin-Komplexes eliminiert worden war.

Abschließende Betrachtung der in vitro-Versuche

Der hier beschriebene sensitive und spezifische Assay für Hirudin und Eglin ist ebenfalls für in vivo-Untersuchungen anwendbar und gestattet qualitative und quantitative Aussagen über die Hautresorption von Blutegelwirkstoffen am Tiermodell.

Es mußte auf die herkömmlichen Enzymtests aufgrund nicht ausreichender Empfindlichkeit der Assays (Nachweisgrenze für Eglin ca. 1 µg/100 µl Probevolumen und für Hirudin ca. 5 ng/100 µl) und wegen diese Testsysteme störender Faktoren (z.B. Antithrombin III als Thrombinhemmstoff), die im Blutplasma und Urin vorhanden sind, verzichtet werden.

Weiterhin sind metabolisierte Produkte weder mit Enzymtests, noch mit Radioaktivitätsmessungen alleine zu bestimmen. Eine Metabolisierung ist nur durch die Kombination von Komplexierung und Gelchromatographie mit Radioaktivitätsmessungen nachzuweisen.

C.2 In vivo-Versuche an der Maus

Unser Ziel war der in vivo-Nachweis der perkutanen Resorption von Hirudin und Eglin.

Ausgehend von den Ergebnissen der in vitro-Versuche an der isolierten Schweinehaut sollte nunmehr die Resorbierbarkeit der Inhibitoren des Blutegels an der vitalen Haut gezeigt werden. Da mit radioaktiven Substanzen gearbeitet wurde, schied der Mensch als Versuchsperson aus. Die morphologische Ähnlichkeit von Schweinehaut und Menschenhaut und die bereits in vitro durchgeführten Experimente an Schweinehaut legten es nahe, die Versuche an einem geeigneten Modell mittels Schweinen durchzuführen. Das Problem der radioaktiven Abfallbeseitigung stellte uns bei dieser Tierspezies (Größe!) jedoch vor eine nicht lösbare Aufgabe, so daß wir uns für die Maus als Versuchstier entschieden haben, obwohl bekannt ist, daß die bei dieser Spezies größere Follikeldichte zu höheren Permeationsraten führen kann. Die Ergebnisse aus den Mausexperimenten dürfen deshalb nur unter Vorbehalt auf den Menschen übertragen werden.

Im Falle einer perkutanen Resorption interessieren folgende Fragestellungen:

- Welche Abhängigkeit besteht zwischen der Konzentration der Inhibitoren in der applizierten Salbe und der Resorptionsrate?

- Welche zeitliche Abhängigkeit zeigt sich bei der Permeation?

- Welche Menge der applizierten Inhibitoren wird im Urin innerhalb 24 Stunden ausgeschieden?

- Findet eine Aufnahme der resorbierten Inhibitoren in Organe statt und werden sie mit dem Kot ausgeschieden?

- Wird Hirudin bzw. Eglin bei der Permeation durch die Haut, im Blut, im Urin oder im Kot abgebaut?

C.2.1 Radioaktivitätskonzentration (*Aktivitätskonzentration) im Blut in Abhängigkeit von der applizierten Radioaktivitätsmenge

Die radioaktiv markierten Inhibitoren wurden in variierender *Aktivitätskonzentration sowohl einer Salbengrundlage (Rezept Plantorgan) als auch einer konzentrierten Blutegel-Rohextraktsalbe (500 ATE/g) zugesetzt. Diese Externa wurden den geschorenen Mäusen auf die Rückenhaut aufgetragen (siehe B.7.2).

Es wurde eine Hautfläche von 25 cm^2 behandelt. Tabelle 5 zeigt die gemessenen Radioaktivitäten im Blut 1 h nach der letzten Salbenapplikation. Hier sind nur die mit konzentrierter Blutegel-Rohextraktsalbe erhaltenen Werte dargestellt, da sie völlig identisch waren mit denen, die bei Applikation der ^{125}J-markierten Inhibitoren in Salbengrundlage gemessen wurden.

Da in diesen Versuchen nur die *Aktivitätskonzentrationen im Blut bestimmt wurden, ist es nicht möglich, die Haut-Permeationsrate HPR bzw. die Standard-Haut-Permeationsrate SHPR zu berechnen; hierzu müßte man den Gesamtdurchtritt messen, d.h. die Radioaktivität im Blut, in den Organen und im Urin. Die Radioaktivität des Blutes repräsentiert nur eine partielle Menge der insgesamt resorbierten Radioaktivität; sie stellt sich nach ca. einer Stunde über den Beobachtungszeitraum hinweg auf ein nahezu konstantes Niveau ein (siehe C.2.2), da das Blutkompartiment ein offenes System darstellt, in dem die Konzentration eines Stoffes durch Resorption, Gewebsverteilung und Elimination bestimmt wird.

Es ist aber möglich, aus der Blut-*Aktivitätskonzentration BAK und der applizierten Salben-*Aktivitätskonzentration SAK die Blut-Salbenkonzentration (BSK) bzw. die spezifische Blut-Salbenkonzentration (sBSK) zu berechnen, die eine allgemeinere Aussage über die Salbenkonzentration im Blut erlaubt (vergleichbar mit der Haut-Permeationsrate bzw. der Standart-Haut-Permeationsrate).

Es gelten folgende Beziehungen:

Blut-Salbenkonzentration BSK

$$BSK = \frac{BAK}{SAK} \left[\frac{mg\ Salbe}{ml\ Blut}\right]$$

spezifische Blut-Salbenkonzentration sBSK

$$sBSK = \frac{BAK}{SAK \cdot A \cdot M} \left[\frac{mg\ Salbe}{ml\ Blut \cdot cm^2\ Haut \cdot kg\ Körpermasse}\right]$$

BAK : Blut-*Aktivitätskonzentration $\left[cpm/ml\ Blut\right]$

SAK : Salben-*Aktivitätskonzentration $\left[cpm/g\ Salbe\right]$

A : behandelte Hautoberfläche $\left[cm^2\right]$

M : Körpermasse des Versuchstiers $\left[kg\right]$

Aus der Blut-Salbenkonzentration BSK und der Wirkstoffkonzentration in der Salbe Δc kann die Blutkonzentration BK der Inhibitoren berechnet werden.

Blutkonzentration der Wirkstoffe BK

$$BK = \Delta c \cdot BSK \left[\frac{ATE\ bzw.\ g\ bzw.\ IU}{ml\ Blut}\right]$$

spezifische Blutkonzentration der Wirkstoffe sBK

$$sBK = \frac{\Delta c \cdot BSK}{A \cdot M} \left[\frac{ATE\ bzw.\ g\ bzw.\ IU}{ml\ Blut \cdot cm^2\ Haut \cdot kg\ Körpermasse}\right]$$

Δc : Salben-Wirkstoffkonzentration $\left[ATE\ bzw.\ g\ bzw.\ IU/g\ Salbe\right]$

Tabelle 5: Perkutane Resorption von Hirudin und Eglin in Abhängigkeit von der applizierten *Aktivitätskonzentration

Angegeben sind die Blutspiegel 1 h nach 3 maliger Applikation von 10×10^6/20×10^6/ 30×10^6 cpm Hirudin bzw. Eglin pro g Salbe auf 25 cm² Hautfläche (siehe B.7.2, S. 38)

	SAK [cpm/g]	BAK [cpm/ml]	BSK [mg/ml]	sBSK $\left[\frac{mg}{ml \cdot cm^2 \cdot kg}\right]$
Hirudin	10×10^6	5 800 [a]	0,58	0,77
	20×10^6	13 000 [b]	0,65	0,87
	30×10^6	17 300 [a]	0,58	0,77
Mittelwert			0,60	0,80
Eglin	10×10^6	4 900 [a]	0,49	0,65
	20×10^6	13 500 [b]	0,68	0,90
	30×10^6	18 800 [a]	0,63	0,84
Mittelwert			0,60	0,80

a Mittelwerte von 2 Messungen b Mittelwerte von 10 Messungen (siehe C.2.3.1, S. 68 und 69)

Hirudin und Eglin permeieren unter den beschriebenen Versuchsbedingungen konzentrationsabhängig, d.h. proportional zur aufgetragenen Menge an radioaktiver Substanz, die in 1 g Salbe gelöst war (BAK ~ SAK). Die Durchtrittsfähigkeit von Hirudin und Eglin durch die Mäusehaut ist, gemessen anhand der Radioaktivität im Blut, vergleichbar.

Exemplarisch wurden zwei Versuche mit Salbengrundlage (20×10^6 cpm/g Salbe) unter analogen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen denen mit Rohextraktsalbe. Es ist somit festzuhalten, daß die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Resorption von Hirudin und Eglin unabhängig von der galenischen Zubereitung (Salbengrundlage oder Rohextraktsalbe) sind. Es kann daraus gefolgert werden, daß die applizierten Wirkstoffkonzentrationen noch zu keiner Sättigung der Hautschichten geführt haben - die Sättigung würde sich in einer abfallenden BSK ausdrücken - die Blut-*Aktivitätskonzentration befindet sich somit im Bereich der proportionalen Abhängigkeit.

Für alle nachfolgenden Versuche wurde die Blutegel-Rohextraktsalbe mit 500 ATE/g verwendet, da sich die wässrige Lösung der radioaktiv markierten Substanzen mit dieser Salbe leichter vermengen läßt.

Da die Blut-*Aktivitätskonzentration in linearer Abhängigkeit zur applizierten Salben-*Aktivitätskonzentration steht, kann der Proportionalitätsfaktor für die Blutbestimmungen ermittelt werden. Diese konstante Größe wird als Blut-Salbenkonzentration bezeichnet. Der Durchschnittswert beträgt für Hirudin 0,60 mg/ml bzw. 0,80 mg/ml/cm²/kg; für Eglin ebenfalls 0,60 mg/ml bzw. 0,80 mg/ml/cm²/kg.

Mit Hilfe der generell anwendbaren Blut-Salbenkonzentration kann nun die Blutkonzentration BK von Hirudin und Eglin in Bezug auf die applizierte Wirkstoffmenge berechnet werden. Es wurde 1 g Salbe mit der Wirkstoffkonzentration Δc = 500 ATE/g Salbe aufgetragen. Daraus ergibt sich eine Blutkonzentration BK (BK = $\Delta c \cdot$ BSK) von 0,3 ATE/ml bzw. eine spezifische Blutkonzentration (sBK = $\Delta c \cdot$ sBSK) von 0,4 ATE/ml/cm²/kg.

Somit läßt sich die Blutkonzentration von Hirudin mit 15 ng/ml bzw. 20 ng/ml/cm²/kg oder mit 9,9 mIU/ml bzw. 13,2 mIU/ml/cm²/kg angeben, da 1 mg Hirudin 20 000 ATE bzw. 660 IU entspricht.

Weiterhin läßt sich daraus die Blutkonzentration für Eglin mit 170 ng/ml bzw. 230 ng/ml/cm²/kg oder mit 0,026 mIU/ml bzw. 0,034 mIU/ml/cm²/kg berechnen, da das Mengenverhältnis Hirudin zu Eglin in der Salbe konstant ist und auf 1 ATE Hirudin 0,57 µg bzw. 0,086 mIU Eglin entfallen (vgl. C.1, S. 42).

C.2.2 Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption

Die mit 20×10^6 cpm ^{125}J-Hirudin bzw. ^{125}J-Eglin versetzte Exhirudsalbe wurde wie unter B.7.3 beschrieben auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert.

Die Blutentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (Tabelle 6 und 7, Abb. 14 und 15).

Tabelle 6: Blutspiegelverlauf von Hirudin nach Applikation von 1 g Salbe mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20 x 10^6 cpm/g Salbe in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitraum (0 - 24 h) (siehe B.7.3, S. 39).

	Zeitpunkt der Blutentnahme nach Salben-applikation [h]	BAK $\left[\frac{cpm}{ml}\right]$	sBSK $\left[\frac{mg\ Salbe}{ml \cdot cm^2 \cdot kg}\right]$
1. Versuch	0 [a]	2 250	0,15
	1	10 700	0,71
	2	9 000	0,60
	3	9 200	0,61
	4	10 500	0,70
	24	11 300	0,75
2. Versuch	0 [a]	4 000	0,27
	1	6 000	0,40
	2	11 500	0,77
	3	9 750	0,65
	4	9 440	0,63
	24	9 000	0,60
3. Versuch	0 [a]	8 250	0,55
	1	13 200	0,88
	2	8 750	0,58
	3	7 670	0,51
	4	13 000	0,87
	24	18 000	1,20

[a] Zeitpunkt 0: Beendigung der letzten von 3 Salbenapplikationen
SAK, BAK, sBSK siehe C.2.1, S. 57

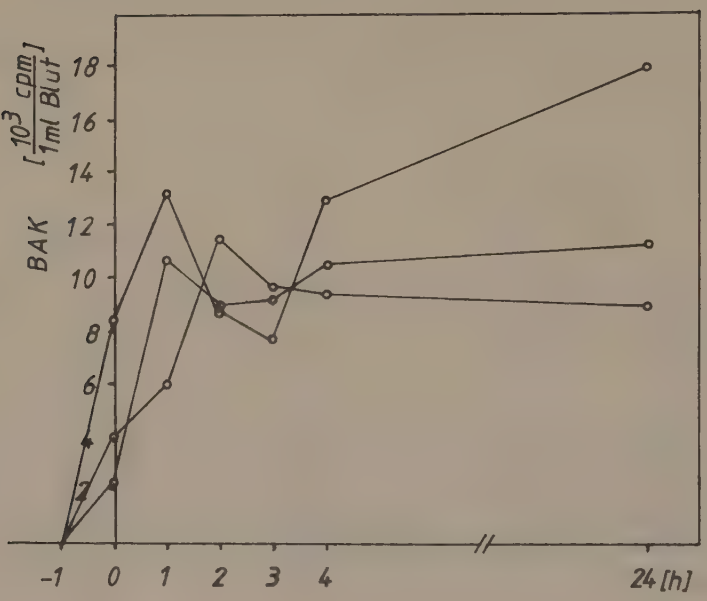

Abb. 14 Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption von Hirudin (siehe B.7.3, S. 39)

Ordinate: Blut-*Aktivitätskonzentration BAK

Abszisse: -1 entspricht dem Zeitpunkt der 1. Salbenapplikation

0 entspricht dem Zeitpunkt der Beendigung der letzten von 3 Salbenapplikationen; d.h. 1 h nach der 1. Applikation bzw. 0,5 h nach der 2. Applikation

1 1 h nach letzter Salbenapplikation etc.

Tabelle 7: Blutspiegelverlauf von Eglin nach Applikation von 1 g Exhirud forte mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20 x 10^6 cpm/g Salbe in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitraum (0 - 24 h) (siehe B.7.3, S. 39).

	Zeitpunkt der Blutentnahme nach Salbenapplikation [h]	BAK [cpm/ml]	sBSK [mg Salbe / ml . cm² . kg]
1. Versuch	0 [a]	5 000	0,33
	1	11 670	0,78
	2	11 400	0,76
	3	12 700	0,85
	4	12 100	0,81
	24	18 700	1,25
2. Versuch	0 [a]	2 500	0,17
	1	10 770	0,72
	2	9 400	0,63
	3	10 530	0,70
	4	10 940	0,73
	24	17 780	1,19
3. Versuch	0 [a]	1 400	0,09
	1	11 000	0,73
	2	8 300	0,55
	3	8 700	0,58
	4	9 800	0,65
	24	9 000	0,60

[a] Zeitpunkt 0: Beendigung der letzten von 3 Salbenapplikationen
SAK, BAK, sBAK siehe C.2.1, S. 57

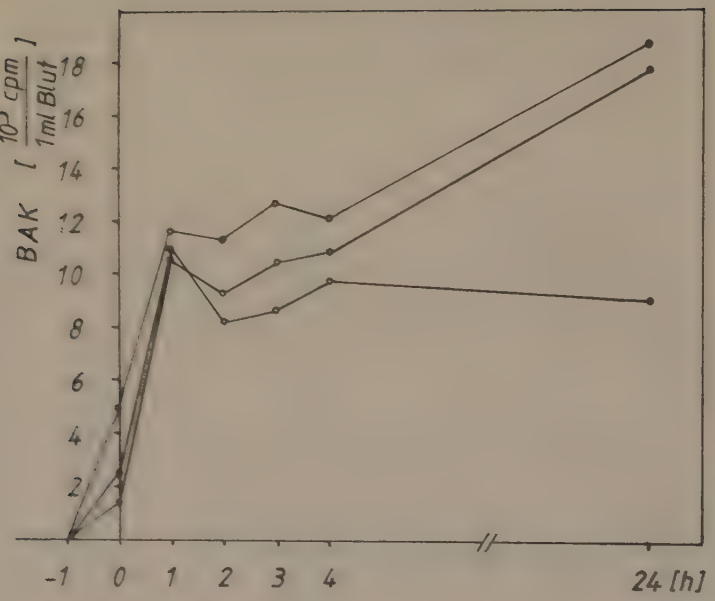

Abb. 15 Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption von Eglin (siehe B.7.3, S. 39)

Ordinate: Blut-*Aktivitäskonzentration BAK

Abszisse: -1 entspricht dem Zeitpunkt der 1. Salben-applikation

0 entspricht dem Zeitpunkt der Beendigung der letzten von 3 Schmierungen; d.h. 1 h nach der 1. Applikation bzw. 0,5 h nach der 2. Applikation

1 1 h nach letzter Salbenapplikation etc.

Da bei der retroorbitalen Blutentnahme zu den festgesetzten Zeiten (0, 1, 2, 3, 4, und 24 h nach der 3. Salbenapplikation) nur wenige Tropfen Blut gewonnen werden konnten, war es notwendig, die in diesen Volumina enthaltene Radioaktivität auf ein einheitliches Volumen (1 ml) umzurechnen, um die Zeitabhängigkeit der Konzentrationsveränderung verfolgen zu können.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Zeitabhängigkeit der transkutanen Resorption von Hirudin und Eglin zeigen einen steilen Anstieg der Radioaktivität im Blut bereits nach der 1. Salbenapplikation. Das Konzentrationsmaximum ist 1 bis 2 Stunden nach der letzten Schmierung erreicht. Die Tatsache, daß die Werte nach 24 Stunden noch nicht abgefallen sind, oft sogar noch ansteigen, ist damit zu erklären, daß die Inhibitoren auch ins Gewebe diffundieren. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Blut und Gewebe ein. Diese Verteilung führt zu einem Blutspiegel, der trotz schneller renaler Elimination der Inhibitoren über Stunden konstant bleibt.

MARKWARDT (36) hat bei subkutaner Injektion von Hirudin (100 000 ATE/kg) bei Kaninchen ähnliche Ergebnisse erzielt: Über einen Zeitraum bis zu 8 Stunden wurde ein niedriger Hirudinspiegel im Blut erzeugt. Intravenös injiziertes Hirudin (100 000 ATE/kg) hingegen verschwand relativ schnell aus dem Blut. Es wird mit einer Halbwertszeit von 50 bis 60 min eliminiert (40).

C.2.3 Quantitative Auswertung der perkutanen Resorption biologisch aktiver Inhibitoren und deren Verteilung in Blut und Urin

Den Ergebnissen der Konzentrationsabhängigkeit und Zeitabhängigkeit der perkutanen Resorption liegen ausschließlich Radioaktivitätsmessungen zugrunde (siehe C.2.1 und C.2.2).

Es ging uns aber vor allem darum, nachzuweisen, daß die gefundene Radioaktivität mit der biologischen Aktivität der Inhibitoren korreliert. Erst dann sind Aussagen über das Ausmaß der Resorbierbarkeit biologisch aktiver Inhibitoren zulässig. Eine Argumentation, die sich nur auf Radioaktivitätsmessungen stützt, kann nicht ausschließen, daß inaktivierte oder metabolisierte "Inhibitoren" bzw. Inhibitorfragmente resorbiert worden sind.

Der Nachweis der biologischen Aktivität der resorbierten Inhibitoren wurde über ihre Fähigkeit erbracht, Komplexe mit Thrombin (Hirudin) bzw. Chymotrypsin (Eglin) zu bilden. Die Komplexe wurden über ihre Radioaktivität nach gelchromatographischer Fraktionierung detektiert (vgl. C.1). Da eine Mindestradioaktivität (50 000 cpm) für die Gelchromatographie notwendig war, mußten Blutproben und Urinproben mehrerer Mäuse gepoolt und als Sammelprobe analysiert werden.

1 g Exhirudsalbe (500 ATE/g), versetzt mit 20 x 10^6 cpm ^{125}J-Hirudin bzw. ^{125}J-Eglin, wurde innerhalb 1 Stunde in 3 Schmierungen auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert.

1 h nach der letzten Schmierung wurden Blut und Urin wie unter B.7.1 (S. 37) beschrieben entnommen und aufgearbeitet. Die Uringewinnung mit einer Injektionsspritze nach Tötung der Tiere bereitete oft Schwierigkeiten, da sich in der Blase z.T. kein bzw. zu wenig Urin befand. Zum Konzentrationsvergleich wurden die *Aktivitätskonzentrationen jeweils auf ein Volumen von 1 ml Urin umgerechnet.

C.2.3.1 Radioaktivitätsmessungen (Tab. 8 und 9)

Die Versuche wurden an 10 Tieren durchgeführt.

Bei den Radioaktivitätsmessungen liegt die Konzentration für Hirudin und Eglin im Urin um den Faktor 20 bis 60 höher als im Blut, da es über die Nieren zu einer Konzentrierung der im Plasma gelösten Substanzen im Harn kommt.

Die Urinabnahme bereitete - wie schon erwähnt - erhebliche Schwierigkeiten und konnte somit nicht quantitativ durchgeführt werden; d.h. es konnte nur ein Teil des Blaseninhaltes mittels einer Injektionsspritze entnommen werden. Es muß ferner angenommen werden, daß die Flüssigkeitsaufnahme der Tiere vor Versuchsbeginn unterschiedlich war und somit sich auch verschiedene Urinvolumina in den Blasen befanden; dies läßt sich auch aus der großen Schwankungsbreite der Inhibitorkonzentrationen im Urin folgern. Zur Berechnung der Haut-Permeationsrate HPR bzw. der Standard-Haut-Permeationsrate SHPR für den Urinanteil der Inhibitoren wäre eine exakte Uringewinnung notwendig gewesen.

Der Urin wurde gesammelt und zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Inhibitoren verwendet.

Tabelle 8: Perkutane Hirudinresorption: quantitative Auswertung
Applikation von 1 g Salbe mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20×10^6 cpm/g Salbe durch 3 malige Schmierung innerhalb 1 h (siehe B.7.5, S. 40)

	relative Blutspiegel 1 h nach letzter Salbenapplikation		Urinentnahme 1 h nach letzter Salbenapplikation			
Versuch	BAK [cpm/ml]	sBSK [mg Salbe / ml · cm² · kg]	Urin [cpm]	Volumen [ml]	UAK [cpm/ml]	UAK/BAK [cpm/ml / cpm/ml]
1	13 900	0,93	-	-	-	-
2	13 600	0,91	-	-	-	-
3	7 600	0,51	16 000	0,06	267 000	35
4	10 000	0,67	48 000	0,08	600 000	60
5	22 400	1,49	82 000	0,12	683 000	30
6	15 960	1,06	22 300	0,06	372 000	23
7	10 700	0,71	14 000	0,045	311 000	29
8	10 900	0,73	100 000	0,15	666 600	61
9	16 500	1,10	7 300	0,015	487 000	30
10	8 875	0,59	5 200	0,02	260 000	29
Mittelwert		0,87 ± 0,23				

UAK: Urin-*Aktivitätskonzentration [cpm/ml Urin]
SAK, BAK, sBSK siehe C.2.1, S. 57

Tabelle 9: Perkutane Eglinresorption: quantitative Auswertung
Applikation von 1 g Salbe mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20×10^6 cpm/g Salbe durch 3 malige Schmierung innerhalb 1 h (siehe B.7.5, S. 40)

	relative Blutspiegel 1 h nach letzter Salbenapplikation		Urinentnahme 1 h nach letzter Salbenapplikation			
Versuch	BAK [cpm/ml]	sBSK [mg Salbe / ml · cm² · kg]	Urin [cpm]	Volumen [ml]	UAK [cpm/ml]	UAK/BAK [cpm/ml / cpm/ml]
1	8 800	0,59	9 400	0,02	470 000	50
2	8 800	0,59	29 700	0,13	228 000	26
3	15 550	1,04	114 400	0,18	636 000	41
4	20 600	1,37	-	-	-	-
5	12 350	0,82	-	-	-	-
6	14 200	0,95	65 500	0,08	819 000	58
7	17 800	1,19	115 000	0,13	885 000	50
8	12 500	0,83	-	-	-	-
9	14 000	0,93	70 000	0,12	583 000	42
10	10 770	0,72	43 000	0,1	430 000	40
Mittelwert		$0,90 \pm 0,19$				

UAK: Urin-*Aktivitätskonzentration [cpm/ml Urin]
SAK, BAK, sBAK siehe C.2.1, S. 57

Für Blut ergab sich eine durchschnittliche spezifische Blut-Salbenkonzentration von:

Hirudin: sBSK = 0,87 $\pm$ 0,23 mg Salbe/ml/cm²/kg (n = 10)

Eglin: sBSK = 0,90 $\pm$ 0,19 mg Salbe/ml/cm²/kg (n = 10)
(vgl. C.2.1; Tab. 5, S. 58)

Bei Verletzungen der Haut bzw. einer allergischen Reaktion auf das Enthaarungsmittel wurden erheblich höhere Werte gemessen; hier ergab sich z.B. eine sBSK für Hirudin von 7,33 mg/ml/cm²/kg, d.h. eine Erhöhung um den Faktor 10! Werte, die aufgrund von Hautverletzungen oder Hautirritationen von der Norm stark abwichen, wurden nicht in die Tabelle aufgenommen bzw. in die Auswertung einbezogen.

Desweiteren wurde keine Beeinflussung der Resorption in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet, die zwischen Scherung und Applikation lag.

C.2.3.2 Biologische Aktivitätsmessungen

Für die Messung der biologischen Aktivitäten wurden Seren und Urine gepoolt (siehe Tabelle 8 und 9 und unten), mit einem Überschuß Enzym versetzt (vgl. B.5) und die Mischung gelchromatographisch aufgetrennt. Dabei wurden von den Seren ein Pool, von den Urinen zwei Pools untersucht.

Hirudin:	Seren	1 bis 10	(siehe Tab. 8 und 9)	: Abb. 16
	Urine	3 + 4 + 5	(siehe Tab. 8 und 9) (a):	Abb. 19
		7 + 8	(siehe Tab. 8 und 9) (b):	graphisch nicht dargestellt, da identisch Abb. 19
Eglin:	Seren	1 bis 10	(siehe Tab. 8 und 9)	: Abb. 17
	Urine	1 + 2 + 3	(siehe Tab. 8 und 9) (a):	graphisch nicht dargestellt, da identisch Abb. 21
		6 + 7 + 10	(siehe Tab. 8 und 9) (b):	Abb. 21

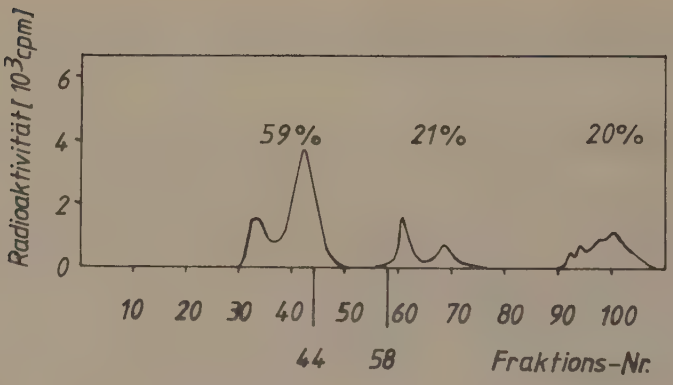

Abb. 16 Gelchromatographie von resorbiertem Hirudin aus Serum nach Komplexierung mit Thrombin (aufgetragene Radioaktivität 44 500 cpm)

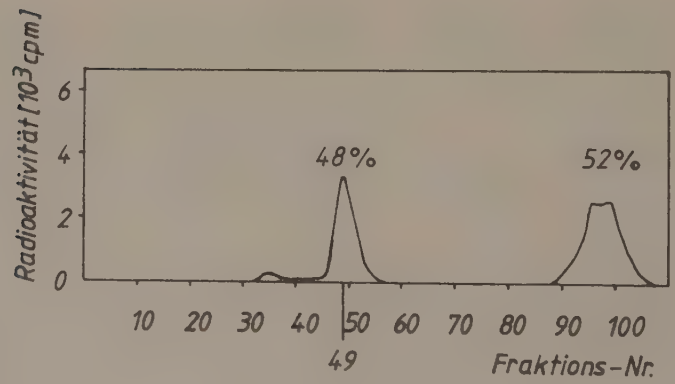

Abb. 17 Gelchromatographie von resorbiertem Eglin aus Serum nach Komplexierung mit Chymotrypsin (aufgetragene Radioaktivität 51 000 cpm)

Methodische Details: siehe B.7.1, S. 37
Ordinate: Radioaktivität pro Fraktions-Nr.

Nach Blutentnahme und Blutgerinnung wurden die Seren abzentrifugiert und anschließend eingefroren. Dabei mußten Radioaktivitätsverluste bis zu ca. 50 % durch im Blutpellet absorbierte Inhibitoren hingenommen werden. Da die Radioaktivitätsmengen in den Einzelseren relativ gering waren, war es notwendig die Seren aus den Versuchen 1 bis 10 zu poolen. Das sich daraus ergebende verhältnismäßig große Volumen von einigen Millilitern war für die anschließende Gelchromatographie ungünstig. Um weitere Verluste zu verhindern, wurde jedoch auf das Einengen mittels der Kollodiumhülse verzichtet. Der Nachteil einer weniger scharfen Auftrennung, verursacht durch das relativ große Probevolumen (ca. 3 ml), wurde in Kauf genommen.

Im Elutionsbereich des Enzym-Inhibitor-Komplexes konnten für Hirudin 59 % (Fraktion 44) und für Eglin 48 % (Fraktion 49) an biologisch aktivem Material detektiert werden.

Bei der Gelchromatographie des Hirudin-Thrombin-Komplexes fanden sich im Fraktionsbereich 55 bis 70 zwei weitere Peaks mit 21 % der insgesamt eluierten Radioaktivität, was auf die Bildung nicht komplexierungsfähiger Hirudinfragmente hinweist (vgl. S. 53).

Im Salzbereich (Fraktion 90 - 110) wurde bei Hirudin eine Radioaktivität von 20 % und bei Eglin von 52 % der insgesamt eluierten *Aktivität ermittelt.

Die verhältnismäßig hohe Radioaktivität im Salzbereich läßt sich durch folgende Überlegungen begründen:

1) Bei der Markierung wurde das als Markierungsreagenz verwendete Na ^{125}J nicht vollständig abgetrennt (siehe C.1, S. 52).

2) Eine längere Lagerung der radioaktiv markierten Substanzen hat deren Inaktivierung bzw. ihren Abbau zur Folge.

3) Da bei der Serumaufbereitung z.T. Zellyse auftrat und auf diese Weise intrazelluläre Substanzen, u.a. auch proteolytische Enzyme freigesetzt werden, kann ein Abbau der Inhibitoren durch intrazelluläre Proteasen verursacht worden sein.

Die Frage, ob die hohen Radioaktivitätswerte im Salzbereich zum größten Teil eine Folge der Serumaufbereitung, z.B. der Zellyse und dadurch verursachten Proteolyse waren, konnte durch Untersuchung der bei diesen Versuchen gewonnenen Urinproben geklärt werden. Dazu galt es herauszufinden, ob die im Urin ausgeschiedenen Inhibitoren Hirudin und Eglin im Verlauf der Resorption oder sonst irgendwo im Organismus verändert bzw. durch enzymatische Spaltung inaktiviert worden waren. Zur Klärung dieser Frage wurden 2 Versuchsreihen durchgeführt:

1) Zunächst wurde frisch markiertes Hirudin bzw. Eglin zur quantitativen Komplexierung mit Thrombin bzw. Chymotrypsin im Überschuß versetzt und die jeweilige Mischung mittels der Sephadex G-75 Säule fraktioniert (Abb. 18 bzw. 20).

2) In analoger Weise wurde der gepoolte Urin aus Versuch C.2.3 mit Thrombin bzw. Chymotrypsin versetzt und die Mischung wieder mittels der Sephadex G-75-Säule fraktioniert (Abb. 19 bzw. 21).

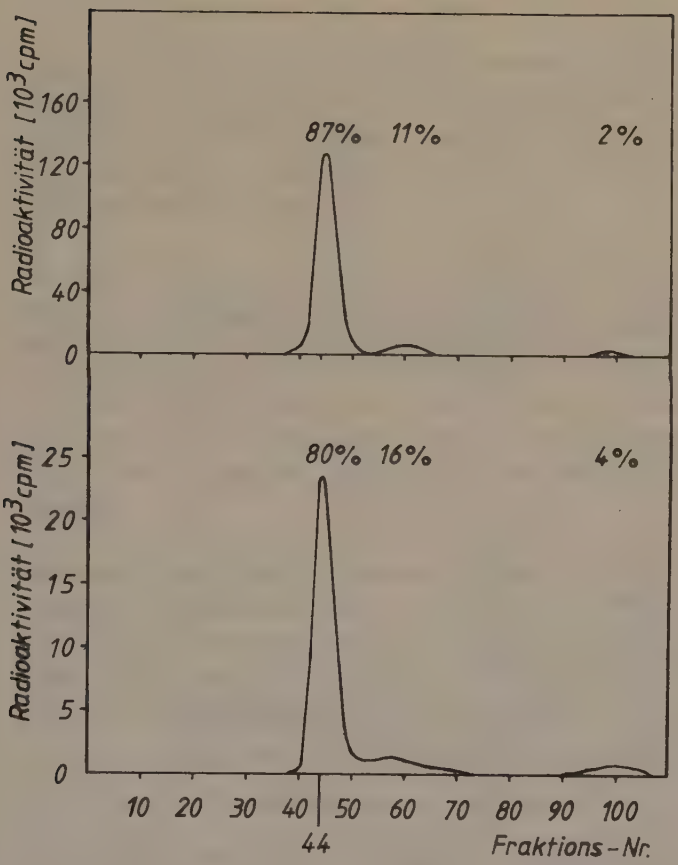

Abb. 18 Gelchromatographie von frisch markiertem ^{125}J-Hirudin nach Komplexierung mit Thrombin (aufgetragene Radioaktivität: 765 000 cpm)

Abb. 19 Gelchromatographie von resorbiertem ^{125}J-Hirudin aus Urin nach Komplexierung mit Thrombin (aufgetragene Radioaktivität: 140 000 cpm)

Methodische Details: siehe B.7.1, S. 37 und 38
Ordinate: Radioaktivität pro Fraktions-Nr.

Die %-Zahlen in den Abb. geben den eluierten Radioaktivitätsanteil an.

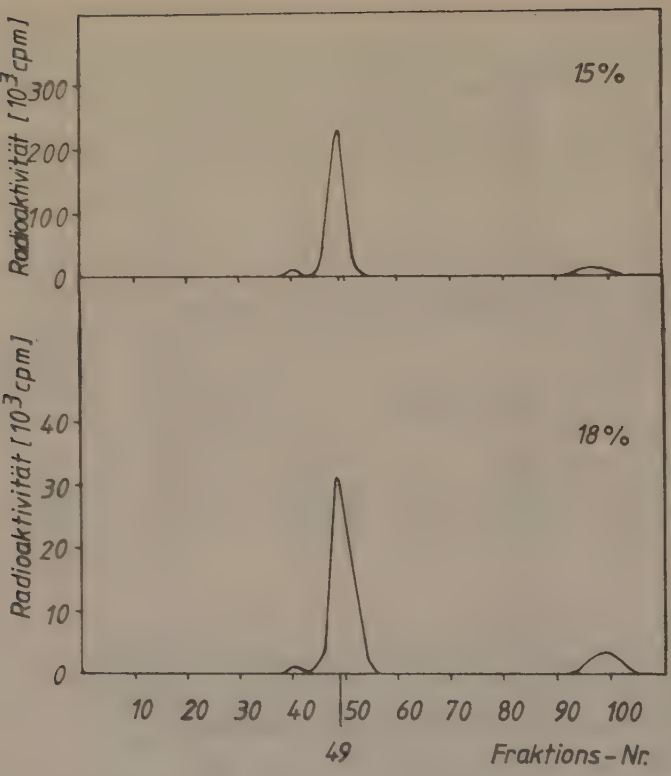

Abb. 20

Abb. 21

Abb. 20 Gelchromatographie von frisch markiertem ^{125}J-Eglin nach Komplexierung mit Chymotrypsin (aufgetragene Radioaktivität: 1 300 000 cpm)

Abb. 21 Gelchromatographie von resorbiertem ^{125}J-Eglin aus Urin nach Komplexierung mit Chymotrypsin (aufgetragene Radioaktivität: 213 000 cpm)

Methodische Details: siehe B.7.1, S. 37 und 38
Ordinate: Radioaktivität pro Fraktions-Nr.

Die %-Zahlen in den Abb. geben den eluierten Radioaktivitätsanteil an.

Offensichtlich kann kein wesentlicher Unterschied bei der Verteilung der Radioaktivität in den bei der Gelfiltration eluierten Fraktionen nach Komplexierung frisch markierten Inhibitors oder des im Urin ausgeschiedenen Inhibitors mit seinem Zielenzym festgestellt werden.

Der hohe Anteil nicht komplexierungsfähiger Radioaktivität bei den Serumproben setzt sich demnach zusammen aus zuvor nicht abgetrenntem Na ^{125}J sowie aus Abbauprodukten der Inhibitoren, die bei der Serumaufbereitung entstehen. Wenn Abbauprodukte der Inhibitoten im Serum vorlägen, müßten sie auch im Urin erscheinen. Die hohe Radioaktivität im Salzbereich bei den Serumproben muß deshalb als Artefakt der Aufbereitung bezeichnet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die perkutan resorbierten Inhibitoren, die im Plasma erscheinen, als biologisch aktive Proteine vorliegen, die voll inhibitorisch aktiv sind. Ihre Ausscheidung erfolgt unverändert (hinsichtlich der biologischen Aktivität) im Urin.

C.2.4 Inhibitorausscheidung im 24 Stunden-Harn

Für diese Versuche wurde die Salbe (1g Exhirud; 500 ATE/g; 20×10^6 cpm Inhibitor) wie unter B.7.1 beschrieben auf die Rückenhaut der Mäuse appliziert.

Der Urin wurde über 24 Stunden in einem Stoffwechselkäfig gesammelt (siehe B.7.4) und die Radioaktivität und biologische Aktivität bestimmt (siehe B.7.1 b).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 und 11 zusammengefaßt.

Während 24 h konnten 1 - 2 % der applizierten Radioaktivität im Urin der Mäuse, gesammelt in einem Soffwechselkäfig, wiedergefunden werden.

Tabelle 10: Radioaktivität im 24 h-Urin nach Applikation von ^{125}J-Hirudin
Applikation von 1 g Salbe mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20 x 10^6 cpm/g Salbe
(siehe B.7.4, S. 39)

	Radioaktivität im 24 h-Urin [cpm]	HPR_u $\left[\frac{cpm}{h \cdot cm^2}\right]$	% der applizierten Radioaktivität	$SHPR_u$ $\left[\frac{\mu g}{h \cdot cm^2}\right]$
1. Versuch	184 000	307	0,9	15
2. Versuch	256 000	427	1,3	21
3. Versuch	250 000	417	1,3	21
4. Versuch	280 000	467	1,4	23
5. Versuch	404 000	673	2,0	34
Mittelwert				23 $\pm$ 4,6

Tabelle 11: Radioaktivität im 24 h-Urin nach Applikation von ^{125}J-Eglin
Applikation von 1 g Salbe mit einer Salben-*Aktivitätskonzentration SAK von 20 x 10^6 cpm/g Salbe
(siehe B.7.4, S. 39)

	Radioaktivität im 24 h-Urin [cpm]	HPR_u $\left[\frac{cpm}{h \cdot cm^2}\right]$	% der applizierten Radioaktivität	$SHPR_u$ $\left[\frac{\mu g}{h \cdot cm^2}\right]$
1. Versuch	305 000	508	1,5	25
2. Versuch	262 000	437	1,3	22
3. Versuch	259 000	432	1,3	22
4. Versuch	300 000	500	1,5	25
5. Versuch	240 000	400	1,2	20
Mittelwert				23 $\pm$ 1,8

HPR_u : Urinanteil u der Haut-Permeationsrate HPR (vgl. C.1, S 43)

$SHPR_u$: Urinanteil u der Standard-Haut-Permeationsrate SHPR (vgl. C.1, S. 43)

Da sich im gesammelten Urin auch Kot befand, wurde nach Abfiltrieren der festen Kotbestandteile (siehe B.7.1) der Nachweis der biologischen Aktivität exemplarisch am Hirudin durchgeführt.

Mit dem Kotextrakt wurde ebenso verfahren wie mit Blut und Urin, d.h. nach Komplexierung des ^{125}J-Hirudins mit Thrombin wurde der Extrakt (1 ml) auf die Sephadex G-75 Säule gegeben (Abb. 22).

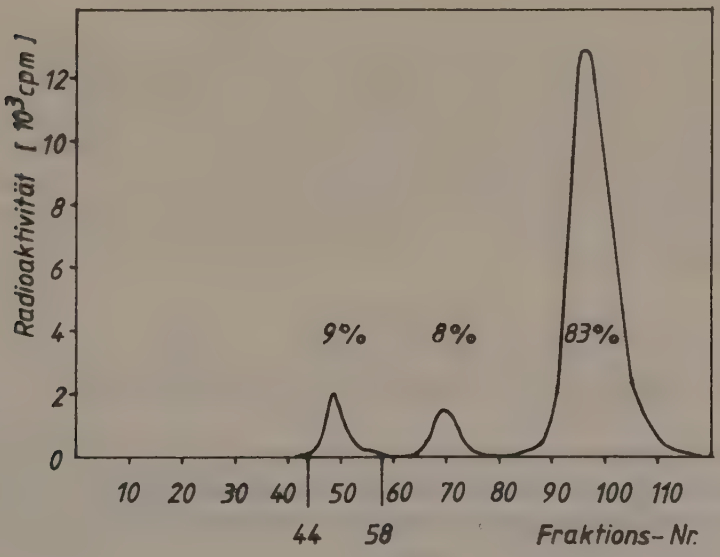

Abb. 22 Gelchromatographie von im Kot-Urin-Extrakt enthaltenem ^{125}J-Hirudin nach Komplexierung mit Thrombin (aufgetragene Radioaktivität: 150 000 cpm)

Methodische Details siehe B.7.1, S. 38
Ordinate: Radioaktivität pro Fraktions-Nr.

Im Fraktionsbereich 45 bis 60 befindet sich ein Peak, der 9 % der aufgetragenen Radioaktivität enthält. Es dürfte sich hier um ein größeres Abbauprodukt des Hirudins handeln, das noch mit Thrombin einen Komplex zu bilden vermag (vgl. Abb. 9, 10, 16, 19).

Von Fraktion 65 bis 75 waren 8 % der Radioaktivität zu finden, die auf inaktiviertes Hirudin zurückzuführen sein dürften (Abb. 10).

Im Salzbereich waren 83 % der Radioaktivität zu finden. Hirudin wurde demzufolge im Kot-Urin-Extrakt weitgehend abgebaut. Im Hinblick auf die bereits diskutierten Versuchsergebnisse (C.2.3.2) kann geschlossen werden, daß der Abbau während der Urinsammlung im Stoffwechselkäfig erfolgte. Dieses Ergebnis ist angesichts der zahlreichen Proteasen im Gastrointestinaltrakt, die teilweise mit dem Kot ausgeschieden werden, nicht verwunderlich (2).

C.2.5 Verteilung der Radioaktivität in den Organen

Die Organentnahme erfolgte nach Entbluten der in den unter C.2.3 beschriebenen Versuchen verwendeten Mäuse. In den einzelnen Organen wurden zum Teil erhebliche Mengen an Radioaktivität gefunden. Die Ergebnisse beziehen sich hierbei nur auf ^{125}J-Hirudin.

Tabelle 12: Verteilung der Radioaktivität in exemplarisch ausgewählten Organen [cpm] nach Applikation von 20×10^6 cpm (^{125}J-Hirudin).

Versuch	Mageninhalt	Magen	Nieren	Leber
1	35 000	60 000	34 000	83 000
2	1 800	34 000	38 000	29 000
3	24 000	83 000	30 000	67 000
4	11 000	56 000	30 000	74 000
5	14 000	22 000	40 000	52 000
6	37 000	150 000	53 000	93 000
7	12 000	67 000	29 000	50 000
8	9 000	49 000	17 000	30 000
9	9 400	93 000	41 000	64 000
10	20 000	63 000	15 000	30 000
Prozent der applizierten Radioaktivität	0,09 ± 0,05 %	0,34 ± 0,12 %	0,17 ± 0,04 %	0,29 ± 0,10 %

Der Nachweis der biologischen Aktivität der resorbierten, ^{125}J-markierten Inhibitoren wurde hierbei nicht geführt.

In den einzelnen Organen wurden durchschnittlich folgende Mengen an Radioaktivität gefunden (%: bezogen auf die applizierte Radioaktivität):

Magen: 68 000 cpm (0,34 % bzw. 0,14 mg Salbe/cm²)

Nieren: 33 000 cpm (0,17 % bzw. 0,07 mg Salbe/cm²)

Leber: 57 000 cpm (0,29 % bzw. 0,11 mg Salbe/cm²)

Unter Berücksichtigung des Organgewichts:

Magen (0,2 g): 340 000 $\frac{cpm}{g}$ ≙ 0,68 mg Salbe/g/cm²

Nieren (0,3 g): 110 000 $\frac{cpm}{g}$ ≙ 0,22 mg Salbe/g/cm²

Leber (1,3 g): 43 800 $\frac{cpm}{g}$ ≙ 0,09 mg Salbe/g/cm²

Bei Organentnahme nach 24 h (siehe C.2.2) wurden dieselben Werte ermittelt.

Es liegt nahe anzunehmen, daß die Inhibitoren nach Resorption über den Blutkreislauf im Gewebe bzw. in den Organen verteilt wurden und sich so ein Gleichgewicht zwischen Blut und Gewebe einstellt. Ferner ist festzuhalten, daß sich in den Organen noch Restblut befand, das somit einen Beitrag zu den gemessenen Radioaktivitäten leisten kann.

Abschließende Betrachtung

Folgendes Rechenexempel soll nicht als absolut quantitative Aussage aufgefaßt werden, sondern nur zur Abschätzung der insgesamt resorbierten Menge an radioaktiv markierten Inhibitoren dienen.

Bei einer durchschnittlichen Radioaktivitätsverteilung von 165 000 cpm/g Gewebe und unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Körpergewichts von 30 g, befinden sich rund 5×10^6 cpm Radioaktivität im Körper.

Nach 24 h wurde die mit Salbe exponierte Haut mit Äthanol gereinigt und die restliche Radioaktivität in bzw. auf der Haut bestimmt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 350 000 cpm.

Bildet man nun die Summe aus der im Körper sich befindenden (ca. 5×10^6 cpm), in der exponierten Haut noch vorhandenen (ca. 350 000 cpm) und im 24 h-Urin ausgeschiedenen (ca. 350 000 cpm) Menge an Radioaktivität, so sind nach 24 Stunden rund 30 % der applizierten Radioaktivität in den Körper eingedrungen. Von den restlichen 70 % ist ein Teil auf der Haut verblieben, ein anderer Teil ist beim Schmiervorgang verlorengegangen (z.B. auf den Handschuhen, an der Kammerwand etc.).

D ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war der in vivo-Nachweis einer perkutanen Resorption von Proteinase-Inhibitoren des Blutegels aus Blutegelextrakt-Lösungen und aus -Salben. Untersucht wurde das Resorptionsverhalten des Thrombininhibitors Hirudin (MG ca. 7 000) und des Elastase-Chymotrypsin-Inhibitors Eglin (MG ca. 8 000).

Anhand von Versuchen mit isolierter Schweinehaut im Resorptionsmodell nach Stricker wurde der in vitro-Permeationsnachweis erbracht. Die Durchtrittsrate wurde über die Hemmaktivität der Inhibitoren mittels Enzymtest ermittelt (CH. GASTEIGER 1984). Zusätzlich wurden ^{125}J-markierte Inhibitoren zugesetzt; deren Permeationsverhalten unterschied sich praktisch nicht von unmarkiertem Hirudin bzw. Eglin, das mittels der Hemmtests bestimmt wurde. Mit Hilfe der Radioaktivitätsmessungen wurde im Permeationszeitintervall zwischen 24 und 48 h für Hirudin eine Standard-Haut-Permeationsrate (SHPR) von 4,75 µl/h/cm² ermittelt, für Eglin ergab sich eine SHPR von 5,2 µl/h/cm², sofern Inhibitorlösungen appliziert wurden.

Es wurde eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen (bis 0,2 pmol) von biologisch aktiven Inhibitoren ausgearbeitet. ^{125}J-markierte Inhibitoren wurden nach Komplexierung mit Proteinasen gelchromatographisch aufgetrennt und über ihre Radioaktivität in den entsprechenden Molekulargewichtsfraktionen identifiziert. Diese Methode erlaubt eine eindeutige qualitative und quantitative Bestimmung biologisch aktiver, d.h. hemmaktiver Inhibitoren. Dieser spezifische Assay wurde in den in vitro-Versuchen auf Anwendbarkeit geprüft und sodann für die in vivo-Versuche eingesetzt.

Mit Hilfe des beschriebenen Assays konnte nachgewiesen werden, daß Hirudin und Eglin in vivo als biologisch aktive, d.h. hemmaktive Proteine bei der Maus perkutan resorbiert werden. Ihre Identifizierung erfolgte in Blut und in Urin.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen permeierten Hirudin und Eglin konzentrationsabhängig, d.h. die Blut-*Aktivitätskonzentration BAK verhält sich proportional zur applizierten Salben-*Aktivitätskonzentration SAK. Für Hirudin und für Eglin konnte eine durchschnittliche spezifische Blut-Salbenkonzentration sBSK von 0,80 mg Salbe/ml/cm²/kg ermittelt werden.

Die zeitliche Abhängigkeit der perkutanen Resorption zeigt 1 bis 2 h nach Applikation von Exhirudsalbe ein Maximum von permeiertem Hirudin und Eglin im Blut. Der Blutspiegel der Inhibitoren blieb trotz schneller renaler Elimination dieser Proteine über Stunden konstant.

1 h nach dreimaliger Salbenapplikation von 20 x 10^6 cpm betrug die resorbierte Menge an Inhibitoren im Blut, objektiviert durch die spezifische Blut-Salbenkonzentration sBSK, 0,87 $\pm$ 0,23 mg Salbe/ml/cm²/kg für Hirudin und 0,90 $\pm$ 0,19 mg Salbe/ml/cm²/kg für Eglin.

Berechnet über die Inhibitorausscheidung im 24 h-Harn betrug die Standard-Haut-Permeationsrate $SHPR_u$ für Hirudin 23 $\pm$ 4,6 und für Eglin 23 $\pm$ 1,8 µg Salbe/h/cm².

E LITERATURVERZEICHNIS

1 BLOMBÄCK B., in: M. F. SCULLY und V. V. KAKKAR (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - Chemestry and Clinical Usage, S. 3, Churchill Livingstone, Edingburgh - London - New York (1979)

2 BOHE M., A. BORGSTRÖM, S. GENELL, K. OHLSSON: Determination of Immunoreaktive Trypsin, Pancreatic Elastase and Chymotrypsin in Extracts of Human Feces and Ileostromy Drainage. Department of Surgery, Clinical Chemistry and Experimental Research, Malmö General Hospital, University of Lund, Malmö, Sweden, 27, Reprint, Publisher: S. Karger AG, Basel, Printed in Switzerland, 8 - 15 (1983)

3 BOTTENBERG H.: Die Blutegelbehandlung. Hippokrates Verlag, Stuttgart (1935)

4 BRANDIS F. T., H. ROTHE: Behandlungsmöglichkeiten mit Exhirud, einem Nativ - Blutegelvollsekret - Präparat. Therapie der Gegenwart, 96, Sonderdruck aus Heft 2 (1957)

5 CALDWELL M. J.: The effect of various enzyme inhibitors and hirudin on the blood clotting mechanism. Ph. D. Dissertation, Wayne State University (1964)

6 DAVIE E. W., K. FUJIKAWA, K. KURACHI, W. KISIEL: The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. in: Meister A.: Advances in Enzymology, Vol 48, John Wiley and Sons, New York - Chichester - Brisbane - Toronto, 277 (1979)

7 DEUSER E.: Über Behandlungsmethoden von Distorsionen, Kontusionen und Hämatomen im Sportgeschehen. Sportarzt und Sportmedizin, 22, 112 - 113 (1971)

8 DODT J., H.-P. MÜLLER, U. SEEMÜLLER, J.-Y. CHANG: The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor. Applikation of colour carboxymethylation. FEBS Letters 165, 180 (1984)

9 DODT J.: Dissertationsarbeit; in Vorbereitung (1984)

10 DOWNING M. R., R. J. BUTKOWSKI, M. M. CLARK und K. G. MANN, J. biol. Chemistry 250, 8897 (1975)

11 DUCKERT F.: Die Anwendung chromogener Substrate in der Gerinnungsanalytik. Aktuelle Diagnostik. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (1976)

12 EGBERG N., K. BERGSTROM, in: M. F. SCULLY und V. V. KAKKAR (Hrsg.), Chromogenic Peptide Substrates - chemestry and Clinical Usage, S. 61, Churchill Livingstone, Edinburgh - London - New York (1979)

13 FRAKER P.-J., J. C. SPECK: in: Biochem. Biophys. R. Comm. 80. 849 - 857 (1978)

14 FRITZ H., K.-H. OPPITZ, M. GEBHARDT, I. OPPITZ, E. WERLE, R. MARX: Über das Vorkommen eines Trypsin - Plasmin - Inhibitors in Hirudin. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 350, 91 - 92 (1969)

15 FRITZ H., M. GEBHARDT, R. MEISTER, E. FINK: Trypsin - plasmin inhibitors from leeches. Isolation, amino acid composition, inhibitory characteristics. in: FRITZ H., H. TSCHESCHE: Proceedings of the 1st international research conference on proteinase inhibitors. Walter de Gruyter, Berlin - New York, 271 - 293 (1971)

16 GASTEIGER CH.: Perkutane Resorption von Blutegelwirkstoffen (Eglin, Hirudin) an der isolierten Schweinehaut. Dissertation, in Vorbereitung (1984)

17 GLOOR M.: Pharmakologie dermatologischer Externa. Physiologische Grundlagen - Prüfmethoden - Wirkungseffekte. Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1982)

18 GOLLNICK N.: Zur Behandlung des Status varicosus. Med. Welt, 47, 2417 - 2420 (1963)

19 HARPER H. A., G. LÖFFLER, P. E. PETRIDES, L. WEISS: Physiologische Chemie. Springer, Berlin - Heidelberg - New York, (1979)

20 JAKOBI C.: 5. Über Hirudin. Dtsch. med. W. schr., 30, 1786 - 1787 (1904)

21 HARTLEY B. S.: Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser B 257, 77 (1970)

22 HAYCRAFT J. B.: On the action of a secretion obtained from the medical leech on the coagulation of the blood. Proc. Roy. Soc., London, Bd 36, 478 - 487 (1884)

23 KARLSON P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

24 KISIEL W., D. J. HANAHAN: Biochem. biophysic. Res. Commun. 59, 570 (1974)

25 KÖSTERING H., F. KÖNIG, H. KOSITZKI, W. RIESENKAMP, N. HAUNSCHILD: Thrombenbehandlung durch Hirudin. Untersuchungen über die Wirkung der Exhirud^{R}-Blutegelsalbe auf gleichstrominduzierte Thromben in der Ohrvene der Maus. Der Praktische Arzt, 20. Jg., Sonderdruck aus Heft 9, 1 - 8 (1973)

26 KREJCI K., H. FRITZ: Structural homology of a trypsin - plasmin inhibitor from leeches (Bdellin B-3) with secretory trypsin inhibitors from mammals. Febs Letters, 64, 152 - 155 (1976)

27 LANDIS B. H., M. P. ZABINSKY, G. J. M. LAFLEUR, D. H. BING und J. W. FENTON: II, Federal. Proc. 37, 1445 (1978)

28 LASKOWSKI M. jr., R. W. SEALOCK: Protein proteinase inhibitors - molekular aspects. in: The enzymes Vol. III (Ed. Boyer P. D.), Academic Press, New York, 375 - 473 (1971)

29 LASKOWSKI M. jr., J. KATO: Ann. Rev. Biochem 49, 593 - 627 (1980)

30 LORAND L., Federat. Proc. 24. 784 (1964)

31 MARKWARDT F.: Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften, 42, 537 (1955)

32 MARKWARDT F.: die antagonistische Wirkung des Hirudins gegen Thrombin in vivo. Naturwissenschaften, 43, 111 (1956 a)

33 MARKWARDT F.: Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins. Naunyn - Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., 229, 389 - 399 (1956 b)

34 MARKWARDT F.: Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. Zeitschr. physiol. Chemie, Bd. 308, 147 - 156 (1957)

35 MARKWARDT F.: Versuche zur pharmakologischen Charakterisierung des Hirudins. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 234, 516 - 529 (1958)

36 MARKWARDT F.: Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1963)

37 MARKWARDT F., in: G. E. PERLMANN und L. LORAND (Hrsg.), Methods in Enzymologie, Bd. 19: Proteolytic Enzymes, S. 924, Academic Press, New York - London - San Francisco (1970)

38 MARKWARDT F., P. WALSMANN: Die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 312, 85 - 98 (1958)

39 MARKWARDT F., P. WALSMANN: Reindarstellung und Analyse des Thrombininhibitors Hirudin. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 1381 - 1386 (1967)

40 MARKWARDT F., J. HAUPTMANN, G. NOWAK, CH. KLESSEN und P. WALSMANN: Pharmacological Studies on the Antithrombotic Action of Hirudin in Experimental Animals, Thrombosis and Halmostasis, 47 (3), 226 - 229, Stuttgart, (1982)

41 MARX R.: Antithrombin III: praktische Bedeutung und neues, therapeutisches Prinzip. Therapiewoche, 31, 4295 - 4307 (1981)

42 MIDDLETON J. P.: Pathways of penetration of electrolytes through stratum corneum. Br. J. Dermatol. [Suppl. 4] 81, 56 - 61 (1969)

43 MITTELSTAEDT R.: Weitere klinisch - experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa. Arzneimittel - Forschung (Drug Res.), 23. 581 - 583 (1973)

44 PETERSEN T. E., H. R. ROBERTS, L. SOTTRUP - JENSEN, S. MAGNUSSON: Primary structure of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. in: Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 23 th Colloquium. Pergamon Press, Oxford - New York, (Peeters H. - Ed.), 145 - 149 (1976)

45 MORSE I. O.: Alpha$_1$ - Antitrypsin - Deficiency Part 1. The new England J. Med., 299, 1045 - 1048 (1978a)

46 MORSE I. O.: Alpha$_1$ - Antitrypsin - Deficiency Part 2. The new England J. Med., 299, 1099 (1978b)

47 PRATZEL H.: Perkutane Resorption von Hirudin. Forschungsbereich aus dem Institut für Medizinische Balneologie und Klimatologie der Universität München, Marchioninistr. 17 (1983)

48 PRATZEL H.: Arzneimittelforschung, Begriffe und Benennungen zum perkutanen Stofftransport, in Vorbereitung (1984)

49 RINGHAUSEN K. D.: Ein Beitrag zur Behandlung von Erfrierungen. Medizin heute, 12, 398 - 400 (1963)

50 REHM H.: Dissertationsarbeit, in Vorbereitung (1984)

51 ROSENBERG R. D., und P. S. DAMUS, ibid., 248, 6490 (1973)

52 ROSENBERG J. S., D. C. BEELER und R. D. ROSENBERG, J. biol. Chemistry 250. 1607 (1975)

53 SCHAEFER H., A. ZESCH, G. STÜTTGEN: With collaboration of W. SCHALLA: Skin Permeability, Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1982)

54 SCHEUPLEIN R. J.: Permeability of the skin: a review of major concepts and some new developments. J. invest Derm., 67, 672 - 676 (1976)

55 SCHEUPLEIN R.: the skin as a barrier. In: Jarrerr A (ed), The physiology and pathophysiology of the skin. Bd. 5, p 1669 - 1692, Academic Press London, New York, San Francisco (1978a)

56 SCHEUPLEIN R.: Site variations in diffusion and permeability. In: Jarrett A (ed), The physiology and pathophysiology of the skin. Bd. 5, p 1731 - 1752, Academic Press London, New York, San Francisco (1978b)

57 SCHRAMM W., G. WUNDERER, R. MARX, H. FRITZ: Low molekular weight inhibitors of fibrinolysis and blood clotting from leeches and sea anemones. In: Seno S., F. Takaku, S. Irino: Topics in Hematology. Excerpta Medica, Amsterdam - Oxford, 536 - 540 (1977)

58 SCHRAMM W., G. GRÖSCHEL, W. SEGERER und R. MARX; in: R. MARX und H. A. THIES (Hrsg.), Niere, Blutgerinnung und Hämostase. F. K. Schattauer Verlag, 299, Stuttgart - New York (1978)

59 SCHRAMM W.: Antithrombin III - Mangel: klinische Symptome und Möglichkeiten der Therapie. Die gelben Hefte, 21, Heft 1, 1 - 6 (1981)

60 SEEMÜLLER U., M. MEIER, G. SHAMS - BORHAN: Proteinaseinhibitoren aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis. in: Jahresbericht 1977 - Abt. für Klin. Chemie und Klin. Biochemie an der Chirurg. Universitätsklinik München, Dissertations- u. Fotodruck Frank OHG, München, 17 (1977a)

61 SEEMÜLLER U., M. MEIER, K. OHLSSON, H.-P. MÜLLER, H. FRITZ: Isolation and characterisation of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulacytic elastase and cathepsin G) from leeches. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1105 - 1117 (1977b)

62 SEEMÜLLER U.: Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis mit Hemmwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Isolierung, Charakterisierung und Studien zum Hemmechanismus. Dissertation, Gaisser + Hirschmann, Freudenstadt (1979)

63 STOCK D., E. DIEZEMANN, N. ELL, J. GOTTSTEIN: Bringt die lokale Blutegelwirkstoffapplikation Vorteile für die Mobilisierung operierter Gelenke? Therapiewoche, 29, 2626 - 2632 (1979)

64 STÖLZLE A.: Zur Perkutanen Resorption und Immunogenität der Proteinaseinhibitoren Hirudin, Eglin und Bdellin aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis. Dissertation, München (1983)

65 STRÜMPER H.-J.: Blutegeltherapie - gestern und heute. Süddt. Apotheker Zeitung, Bd. 103, 44, 1457 (1963)

66 STÜTTGEN G.: Hautpermeabilität u. Hautoberfläche. In: Symp. Derm. Brno, (1964) pp. 335 - 345, Facultas Medica Universitatis Brunensis (1965a)

67 STÜTTGEN G.: Die Resorptionsmechanismen der Haut. In: II Symp. Dermat. Brno, (1964b) pp. 371 - 373, Facultas Medica Universitatis Brunensis, (1965b)

68 STÜTTGEN G.: Die normale u. pathologische Physiologie der Haut. Fischer - Verlag, 314 - 336, Stuttgart (1965c)

69 STÜTTGEN G.: Hautresorption und Hautstoffwechsel. Verhandlungsbericht des 70. Kongresses der Deutschen Ges. für Physikalische Medizin, Bad Nauheim, (1965d)

70 STÜTTGEN G.: Die Haut als Resorptionsorgan in pharmakologischer Sicht. Arzneim. - Forsch. (Drug Res.), 22, Nr. 2, 324 - 329, (1972)

71 STÜTTGEN G., H. BETZLER: Zur Frage der Permeation von Elektrolyten durch die Haut, 1. Mitteilung: in vitro-Versuche mit radioaktiv markierten Ca^{++} -, SO_4^{--} - und PO_4^{---} Ionen an Meerschweinchen- u. Mäusehaut. Arch. klin. u. exp. Derm., 203, 472 - 482 (1956)

72 STÜTTGEN G., H. BETZLER: Zur Frage der Permeation von Elektrolyten durch die Haut, 2. Mitteilung: In vitro- u. vivo-Versuche an menschlicher Haut mit $^{45}Ca^{++}$, Arch. klin u. exp. Derm., 204, 165 - 174 (1957)

73 STÜTTGEN G., H. KRAUSE: Die percutane Absorption von einer beidseitig durchströmten Diffusionskammer zur Prüfung des tritium-markierten Panthenol bei Mensch und Tier. Arch. klin. exper. Derm., 209, 578 - 582 (1960)

74 SVENDSEN L.: Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit synthetischen Substraten. Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (1976)

75 TRONNIER H.: Weitere experimentielle Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Hirudin - haltigen Salbe. Der Hausarzt, 20, 114 - 116 (1969)

76 WALSMANN P.: Über die Standardisierung von Hirudin - Handelspräparaten. Blut, J. F. Lehmanns Verlag, Band X, 203 - 204, München (1964)

77 WALSMANN P. und F. MARKWARDT: Biochemische und pharmakologische Aspekte des Thrombininhibitors Hirudin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Akademie Erfurt, Die Pharmazie, 36, 653 - 658, Erfurt (1981)

78 WESENER G.: Behandlung der oberflächlichen Thrombophlebitis, Ärztl. Praxis, 17, 1660 - 1661 (1965)

79 WESENER G.: Zur Diagnose und Therapie der oberflächen Thrombophlebitis (Varicophlebitis) in der Sprechstunde. Zeitschr. f. Haut- und Geschlechtskrankheiten, 22, 61 - 68 (1967)

80 WITT I.: Biochemische Grundlagen der Gerinnungsdiagnostik mit chromogenen Substraten. Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (1976)

81 ZETTEL G.: Beobachtungen über Exhirud-Salbe bei der Behandlung der Akne vulgaris, Der Landarzt, Zeitschr. f. Allgemeinmedizin, 43, 633 (1967)

L E B E N S L A U F

18.04.1958	Geboren in Neufahrn bei Freising als erstes Kind von Josef und Berta Bruckbauer, geb. Höckmeier
1964 - 1969	Besuch der Volksschule in Neufahrn
1969 - 1978	Besuch des Josef-Hofmiller-Gymnasiums in Freising
1978	Reifeprüfung in Freising
1978 - 1984	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1979	Naturwissenschaftliche (zahnärztliche) Vorprüfung in München
1981	Zahnärztliche Vorprüfung in München
ab Sept. 1981 - 1984	Durchführung der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Fritz und Dr. U. Seemüller in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München
22.02.1984	Staatsexamen in Zahnheilkunde
24.02.1984	Approbation als Zahnarzt